
**Identifizierung von Substanzen zur Verminderung der
Pathogenität von *Vibrio cholerae* durch neuentwickelte
Hochdurchsatz-Screeningverfahren**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Galina Sergeev
aus Karabulak / Kasachstan

1. Referentin: Professorin Dr. Katharina Riedel
2. Referent: Professor Dr. Norbert F. Käufer
eingereicht am: 11.01.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.04.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag

Galina Sergeev, Ronald Frank, Ranjan Kumar Nandy and Werner Tegge:
“Establishment of high-throughput screening assays with *Vibrio cholerae* and the development of new pathogenicity decreasing compounds” (Poster),
2nd European Chemical Biology Symposium, 20.-21. May 2010, Prague,
Programme and Abstracts, p. 53.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	4
1.1. Mikrobiologischer und medizinischer Hintergrund	4
1.1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	4
1.1.2. Historie der Cholera	7
1.1.3. Infektionsmechanismus.....	8
1.1.4. Regulation der Virulenzgenexpression in <i>V. cholerae</i>	10
1.1.5. Pharmakologische Möglichkeiten zur Behandlung bzw. Prävention von <i>V. cholerae</i> Infektionen	14
1.2. Wirkstoffforschung mittels Hochdurchsatz-Screeningverfahren.....	16
1.3. Ziele der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	19
2.1. Material.....	19
2.1.1. Geräte.....	19
2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3. Kits.....	22
2.1.4. Chemikalien	22
2.1.5. Antikörper und Farbstoffe.....	23
2.1.6. Kulturmedien.....	23
2.1.7. Puffer und Lösungen.....	24
2.1.8. Mikroorganismen und Zellkulturen	24
2.1.9. Testsubstanzen.....	25
2.1.10. Primer	27
2.1.11. Expressionsvektor.....	27
2.1.12. Enzyme.....	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.13.	Software.....	28
2.2.	Methoden.....	28
2.2.1.	Arbeiten mit Bakterien.....	28
2.2.2.	Arbeiten mit Zellkulturen	29
2.2.3.	Wachstumsassay: Screening und Evaluierung der Hits	31
2.2.4.	Choleratoxin-Assays (CT-Assays): Screening und Evaluierung der Hits	33
2.2.5.	PPO-Assay: Entwicklung, Etablierung und Screening	39
2.2.6.	Adhäsionsassay: Entwicklung und Etablierung	43
3.	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1.	Wachstumsassay.....	49
3.1.1.	Entwicklung und Etablierung des Wachstumsassays	49
3.1.2.	Screening verschiedener Substanzsammlungen im Wachstumsassay ...	52
3.1.3.	Aktive Substanzen im Wachstumsassay	55
3.1.4.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK).....	56
3.1.5.	Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test	59
3.1.6.	Generierung resistenter Mutanten.....	62
3.1.7.	Gesamtgenom-Sequenzierung	65
3.2.	Choleratoxin-Assay (CT-Assay)	75
3.2.1.	Entwicklung und Etablierung des CT-Assays	75
3.2.2.	Screening verschiedener Substanzsammlungen im CT-Assay	76
3.2.3.	Aktive Substanzen im CT-Assay	78
3.2.4.	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	79
3.2.5.	Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test	80
3.2.6.	Weitere Evaluierung der drei aktivsten Substanzen des CT-Assays	81
3.2.7.	Transkriptomanalysen durchgeführt am NICED, Kalkutta	89
3.3.	Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivitätsassay (PPO-Aktivitätsassay) ..	91
3.3.1.	Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO)	91
3.3.2.	Klonierung und Expression von HemG (PPO) aus <i>V. cholerae</i>	94
3.3.3.	Entwicklung und Etablierung des PPO-Aktivitätsassays.....	99

Inhaltsverzeichnis

3.3.4.	Screening verschiedener Substanzsammlungen im PPO-Aktivitätsassay ..	104
3.4.	Adhäsionsassay	108
3.4.1.	Bakterielle Adhäsion	108
3.4.2.	Entwicklung und Etablierung des Adhäsionsassays	108
4.	Ausblick	117
5.	Literaturverzeichnis	122
6.	Anhang	138
6.1.	Abbildungsverzeichnis	138
6.2.	Tabellenverzeichnis	140
6.3.	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	141
	Danksagung	145

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicinchonininsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, lateinisch für: „ungefähr“, „annähernd“
cDNA	Kopie-Desoxyribonukleinsäure (<i>copy-DNA</i>)
CT, CTX	Choleratoxin
DIP	<i>deletion and insertion polymorphism</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid (A-, C-, G-, T-)-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	et alii (und andere [Autoren]; bei Literaturzitaten)
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FBS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
G _{M1}	Monosialogangliosid
h	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC _x	Wirkstoffkonzentration bei Verringerung des gewünschten Effekts um X %
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IXM	<i>ImageXpress Micro</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1.000 bp)
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
M	molar, mol/l (Stoffmengenkonzentration)
m	milli
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption / ionization</i>)
Mbp	Megabasenpaare (1 Mbp = 1.000.000 bp)
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MeOH	Methanol
MH	Müller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mut.	Mutante

Abkürzungsverzeichnis

n	nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NICED	<i>National Institute of Cholera and Enteric Diseases</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
p	pico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PPO	Protoporphyrinogen IX Oxidase
Proto	Protoporphyrin IX
Proto'gen	Protoporphyrinogen IX
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
QS	Quorum Sensing
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
sec	Sekunde
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SL	Stammlösung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TCP	<i>toxin coregulated pilus</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Abkürzungsverzeichnis

U	Units
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volt
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VPI	<i>Vibrio pathogenicity island</i>
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Vibrio cholerae ist ein Gram-negativer humanpathogener Erreger, der die Durchfallerkrankung Cholera verursacht. Bei Cholera handelt es sich um eine akute intestinale Infektion, die zu starken plötzlich auftretenden Durchfällen und somit innerhalb kürzester Zeit zu einem hohen Wasser- und Elektrolytverlust führt. Die Übertragung von *V. cholerae* erfolgt hauptsächlich über die Zufuhr von kontaminiertem Wasser, seltener über die Aufnahme von kontaminierter Nahrung wie Fisch und Meeresfrüchte. Besonders Entwicklungsländer ohne adäquate Trinkwasseraufarbeitung oder Trennung von Abwässern und Frischwasser leiden unter Cholera-Epidemien. Als natürliches Habitat amtierend neben dem Menschen, Gewässer mit Brackwasser oder Flussmündungen.

Aufgrund der steigenden Resistenzentwicklung gegen die bisher eingesetzten Antibiotika zur Behandlung von *V. cholerae* Infektionen, besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer spezifischer Therapeutika. Für die Suche nach neuen Wirkstoffen wurden im Rahmen dieser Arbeit vier unterschiedliche Mikrotiterplatten-basierte Hochdurchsatz-Screeningverfahren entwickelt und etabliert. Es handelt sich dabei um Verfahren zur Bestimmung von 1. der Wachstumsrate, 2. der Cholera-toxin-Expression, 3. der Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivität und 4. der bakteriellen Adhäsion an Epithelzellen. Die Verfahren 1-3 wurden für ein Screening nach aktiven Substanzen genutzt.

1. Bei dem Screening von 28.000 Verbindungen nach Wachstum-inhibitorischen Substanzen wurden drei aktive Verbindungen identifiziert, die einen spezifischen Effekt auf *V. cholerae* hatten. Die ermittelten MHK-Werte lagen bei 1,6 μM , 3,1 μM und 6,3 μM . Die durch einen MTT-Test ermittelte Zytotoxizität ergab für die drei Substanzen IC_{50} -Werte von 14 μM , 3 μM und 170 μM . Für die Analyse des Targets wurden gegen die aktivste Verbindung, vz0825, resistente *V. cholerae* Mutanten generiert. Gesamtgenom-Sequenzierungen eines Genom-pools von 15 resistenten Mutanten und des Wildtypstamm-Genoms wurden durchgeführt. In einem anschließenden Mutation-Mapping wurde das Targetgen VC_A0531 identifiziert, das für eine Sensor-Histidinkinase kodiert, welche homolog zu KdpD in *E. coli* ist. Die Mutation mit der höchsten Frequenz führte zu einem Aminosäure-Austausch auf Position 283 des Proteins. Innerhalb des Proteins liegt diese Mutation in der Phosphoakzeptor Domäne. Da bisher keine Pharmazeutika bekannt sind, die spezifisch mit dem Zweikomponentensystem von *V. cholerae* interagieren, dient die identifizierte Verbindung als Leitstruktur für die weitere Wirkstoffentwicklung.

2. Bei dem Screening von 20.000 Verbindungen nach Cholera-toxin-Expression-reduzierenden Substanzen wurden mit Hilfe des Reporterstamms MO10 pAKSB sechs aktive Verbindungen identifiziert. Die ermittelten IC_{50} -Werte der drei aktivsten Verbindungen betrugen in diesem Assay 6 μ M, 10 μ M und 14 μ M. Bei der Überprüfung der Ergebnisse durch einen unabhängigen G_{M1} -ELISA ergaben sich IC_{50} -Werte von 1,9 μ M, 6,8 μ M und 6,4 μ M. Die IC_{50} -Werte der Zytotoxizitätsbestimmung im MTT-Test lagen bei 30 μ M, 62 μ M und 74 μ M.

Für die Detektion von Effekten auf der Transkriptionsebene wurden quantitative Real Time-PCR Bestimmungen der Gene *aphA*, kodierend für den Masterregulator der ToxR-Virulenzkaskade, sowie der Virulenzgene *ctxA* und *tcpA*, unter Einwirkung der aktiven Substanzen durchgeführt. Die Analyse zeigte eine Reduktion des Transkriptionslevels der untersuchten Gene. In einer Kollaboration wurde gezeigt, dass in Anwesenheit der 25 μ molaren Konzentration der aktiven Substanz 53760866, die Expression von TCP auf der Bakterienzelloberfläche vollständig unterdrückt wurde. Die identifizierten Verbindungen dienen als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Pathogenität-reduzierender Wirkstoffe.

3. Im Protoporphyrinogen IX Oxidase-Assay wurde dieses essentielle Enzym des Häm-Biosynthesewegs, kloniert, exprimiert und gereinigt. Das Produkt wurde genutzt für die Etablierung eines enzymatischen Aktivitätsassays in 96-Well-Mikrotiterplatten. Bei dem initialen Screening von 11.000 Substanzen wurden drei schwach aktive Verbindungen mit IC_{50} -Werten über 100 μ M identifiziert. Der entwickelte Assay kann in weiteren Screening-Kampagnen sowie für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren des essentiellen bakteriellen Enzyms genutzt werden.

4. Bei dem Adhäsionsassay handelt es sich um ein zellbasiertes Verfahren, bei dem die Adhäsion von *V. cholerae* an IPEC-J2 Epithelzellen detektiert und quantifiziert wurde. Etabliert wurde der Assay in 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Detektion und Quantifizierung der Bakterien erfolgte über die Fluoreszenzmarkierung, Aufnahmen mit einem automatischen Mikroskop und durch automatisierte Bildauswertung.

1. Einleitung

1.1. Mikrobiologischer und medizinischer Hintergrund

1.1.1. *Vibrio cholerae*

V. cholerae ist ein Gram-negatives Bakterium, das zur Gattung der Vibrionen und der Familie der Vibrionaceae gehört. *V. cholerae* ist stäbchenförmig, fakultativ anaerob, freibeweglich und kann die schwere Durchfall-Erkrankung Cholera hervorrufen. Unterteilen lassen sich *V. cholerae* in über 200 Serotypen, wobei bisher nur die Serotypen O1 und O139 mit den großen Cholera-Pandemien in Verbindung gebracht wurden. Der O1 Serotyp lässt sich in zwei weitere Untergruppen unterteilen, den klassischen und den El Tor Biotyp. Harmlosere intestinale Infektionen, verursacht durch non-O1 und non-O139 oder nicht-toxische O1 Stämme, treten eher selten auf und haben eine geringere klinische Signifikanz (1, 2). Neben dem menschlichen Körper sind natürliche Habitate von *V. cholerae*, einschließlich der Serotypen O1 und O139, aquatische Ökosysteme, was sie zu fakultativ humanpathogenen Organismen macht (3-5). Im marinen Milieu adhäriert *V. cholerae* an die Oberfläche von Pflanzen, Algen, Copepoda (Zooplankton), Crustaceae und Insekten (4-6). Auch *V. cholerae* Stämme des O1 Serotyps assoziiert mit marinen Organismen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Stämme an das Chitin der Crustaceae binden und eine Säuretoleranz entwickeln können (7). *V. cholerae* kann wie viele Mikroorganismen größere multizelluläre Strukturen, sogenannte Biofilme, auf Oberflächen bilden. Dabei handelt es sich um eine eigenproduzierte Schleimschicht bestehend aus Polysacchariden, Proteinen und DNA von lysierten Zellen. Biofilme bilden Mikrohabitate, in denen die Mikroorganismen geschützt vor äußeren Einflüssen, wie z. B. Chlor oder Antibiotika, leben und sich vermehren können. *V. cholerae* Stämme der O1 und O139 Serotypen sind ebenfalls in der Lage, dreidimensionale Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu bilden (8-10). Abbildung 1 zeigt die vier Schritte der Biofilmbildung von *V. cholerae*, die einen wichtigen Aspekt im Lebenszyklus von *V. cholerae* darstellt und die umgebungsbedingte Persistenz im natürlichen aquatischen Habitat während der interepidemischen Perioden fördert. Die Biofilmbildung von *V. cholerae* ist abhängig von der Expression des Exopolysaccharids VPS (*Vibrio polysaccharide*) (8, 10, 11). Stämme mit einem Defekt in einem der *vps*-Gene, die notwendig für die Exopolysaccharidsynthese sind, sind zwar in der Lage abiotische Oberflächen zu besiedeln, können jedoch keine dreidimensionalen Biofilmstrukturen bilden. Das Exopolysaccharid hat demnach die Funktion eines „Klebstoffs“ für einen vollentwickelten Biofilm (9, 10).

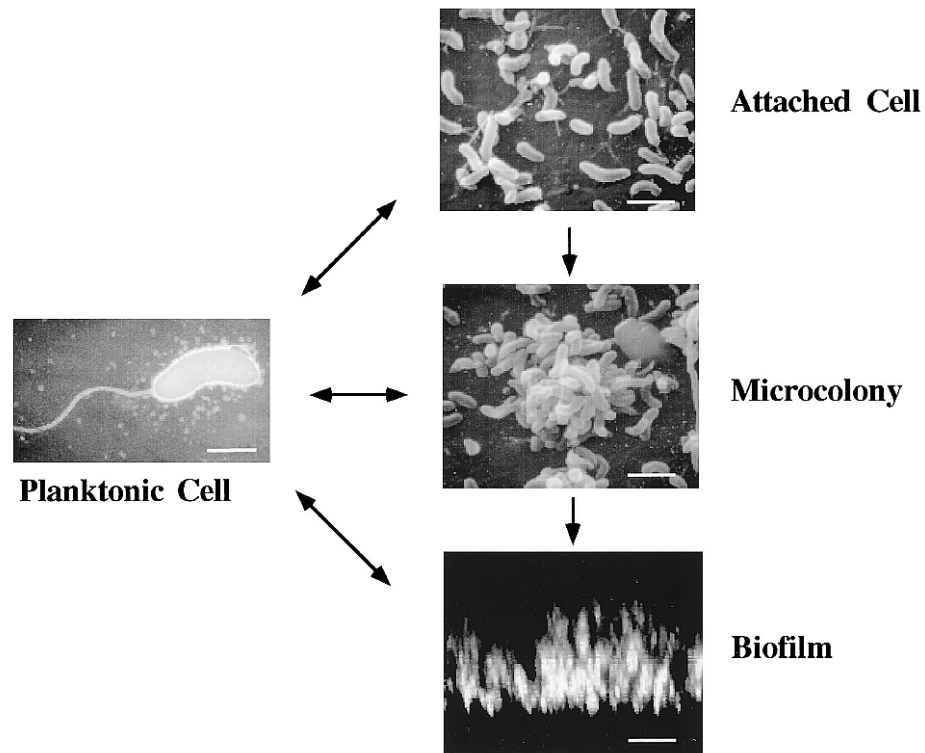


Abbildung 1: Biofilmbildung von *V. cholerae*. Quelle: Watnick und Kolter, 2000 (12).

Planktonische Zelle: Visualisierung mit Transmissions-Elektronen-Mikroskop (Balken = 1 μ m), haftende Zelle und Mikrokolonie: Visualisierung mit Scanner-Elektronen-Mikroskop (Balken = 2 μ m), Biofilm: vertikaler Ausschnitt durch einen 20- μ m Biofilm, visualisiert mit einem Konfokalen Scanner-Laser-Mikroskop (Balken = 10 μ m).

Beobachtet wurde eine Korrelation zwischen den Cholera-Ausbrüchen und dem saisonalen Auftreten der Algenblüte, wobei diese Vorfälle keinen direkten Hinweis auf die Anreicherung der pathogenen *V. cholerae* Stämme darstellen (4, 13). Die aquatischen Habitate enthielten überwiegend Stämme der non-O1 und non-O139 Serotypen, sowie nicht-toxische O1 Stämme (14). Das lässt vermuten, dass die nichtpathogenen *V. cholerae* Stämme die Virulenzgene, die auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert sind, nachträglich aus der Umgebung aufnehmen (15). Somit erlangen die nicht-pathogenen Stämme die Virulenzgene durch die Phagen-transduktion von VPI Φ (*Vibrio pathogenicity island*) und CTX Φ (*cholera toxin*). Dieser Vorgang läuft möglicherweise unter gastrointestinalen Bedingungen ab (16).

V. cholerae erlangt seine Pathogenität nach Übertragung von Virulenzgenen durch eine Infektion mit Bakteriophagen, die sich in das Genom des Bakteriums integrieren (16). Dabei handelt es sich um die einsträngigen filamentösen Phagen VPI Φ und CTX Φ . Der Prozess der Infektion vollzieht sich in zwei Stufen: Zuerst integriert sich die DNA von VPI Φ ins Genom von *V. cholerae*. Die auf VPI Φ lokalisierten Gene kodieren für den TCP-Faktor (*toxin coregulated pilus*). Diese Pili enthalten die Rezeptoren für den

Phagen CTX Φ . Nachdem CTX Φ in die Zelle gelangt ist, integriert er sich ebenfalls in das Chromosom (lysogener Phage). ACF (*accessory colonisation factor*) wird gebildet und es kommt zur Ausschüttung des Cholera-toxins. Da beide Phagen die Zelle jedoch nicht lysieren und deaktiviert werden, verbleibt CTX Φ gemeinsam mit VPI Φ in der Zelle und vermehrt sich mit (17). Die Gensequenz von VPI Φ konnte sowohl in pathogenen Stämmen, als auch sporadisch in aquatisch lebenden Stämmen nachgewiesen werden (15, 18).

Das typische CTX Φ -Genom besitzt zwei Regionen, die Kernregion und die RS2 Region (siehe Abbildung 2 B). Die 4,6 kb große Kernregion kodiert das Cholera-toxin (CT) und die Funktionen, die nötig sind für die Morphogenese der Vibrionen. Die 2,5 kb große RS2 Region kodiert die Faktoren für die Regulation, Replikation und Integration des CTX Φ -Genoms (19). In virulenten *V. cholerae* El Tor und O139 Stämmen ist das CTX Φ -Genom von 2,7 kb-großen RS1-Elementen flankiert, und in dieser Form in das eigene bakterielle Genom integriert. DNA-Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die RS2 Region drei offene Leseraster (ORFs), *rstR*, *rstA* und *rstB*, sowie zwei intergene Regionen, *ig1* und *ig2* besitzt. Die RS1 Region ähnelt der RS2 Region in den genetischen und funktionalen Aspekten, besitzt allerdings ein zusätzliches ORF, das *rstC* (siehe Abbildung 2 A). Die Herkunft und der Mechanismus des Transfers von RS1 zwischen *V. cholerae* Stämmen ist bislang noch ungeklärt (19).

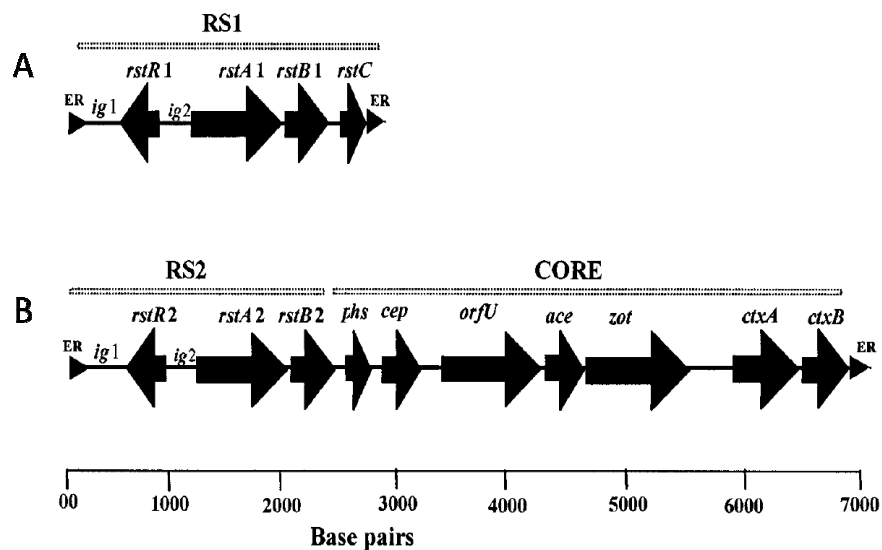


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Genverteilung des RS1-Elements und des RS2-Kernregion-Elements von CTX Φ . Quelle: modifiziert nach Faruque *et al.*, 2002 (20).

Die Pfeile stellen die ORFs dar, Dreiecke stellen ER-Sequenzen (end repeat) dar.

1.1.2.Historie der Cholera

Die neuzeitliche Geschichte der Cholera begann um 1817. Zu diesem Zeitpunkt wurde über einen endemischen Ausbruch der Cholera in Indien berichtet, der sich anschließend über ganz Indien ausbreitete und sich zum ersten pandemischen Ausbruch im südöstlichen Teil Asiens entwickelte. Während des 19ten Jahrhunderts fanden sechs Cholera-Pandemien statt, die in die Übergangsphase zur siebten Pandemie übergingen und in den frühen 1960er Jahren endeten (siehe Abbildung 3), sich allerdings auf der südlichen Hemisphäre sowie in Nord-Amerika und Europa ausbreiteten (21). 1961 begann die siebte Pandemie in Indonesien, die sich nach Indien, in den Mittleren Osten und Afrika ausbreitete und in den frühen 1990ern Südamerika erreichte (16). Die ersten sechs Pandemien wurden durch Stämme des klassischen Biotyps hervorgerufen, wobei der Verursacher der siebten Pandemie ein Stamm des El Tor Biotyps war. In den frühen 1990ern, etwa zur gleichen Zeit als Serotyp O139 als Verursacher der Cholera nachgewiesen wurde, tauchten neue Serotyp-Varianten auf, die sowohl Merkmale des klassischen als auch des El Tor Biotyps in sich trugen, die sogenannten Hybridstämme (22).

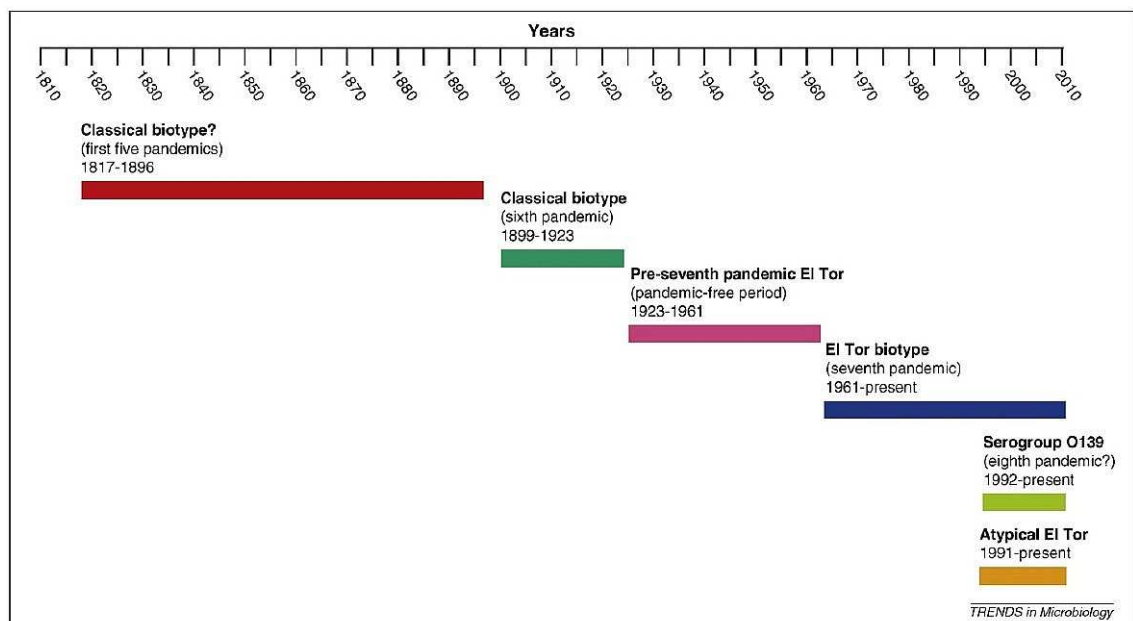


Abbildung 3: Cholera-Epidemiologie seit 1817. Quelle: Safa et al., 2010 (22).

Dargestellt sind die Zeitspannen der sieben Pandemien und der Beginn der achten Pandemie, sowie die verursachenden Stämme.

Cholera ist eine ernsthafte Durchfall-Erkrankung, die unbehandelt innerhalb von wenigen Stunden zum Tod führen kann. Schätzungsweise 3-5 Millionen Cholera-Infizierte und 100.000-120.000 Todesfälle treten jährlich auf (23). Im Jahr 2005 zählte die WHO 131.943 gemeldete Cholerafälle und 2.272 Todesfälle aus 52 Ländern (24).

Die Diskrepanz der realen und gemeldeten Todesfälle entsteht dadurch, dass längst nicht alle durch Cholera verursachten Todesfälle verzeichnet werden, und aus diesem Grund nicht in der Statistik aufgeführt werden können. Abbildung 4 bietet eine Übersicht über die Anzahl der gemeldeten Cholera-Infektionen und die Todesrate in den Jahren 1950 bis 1998.

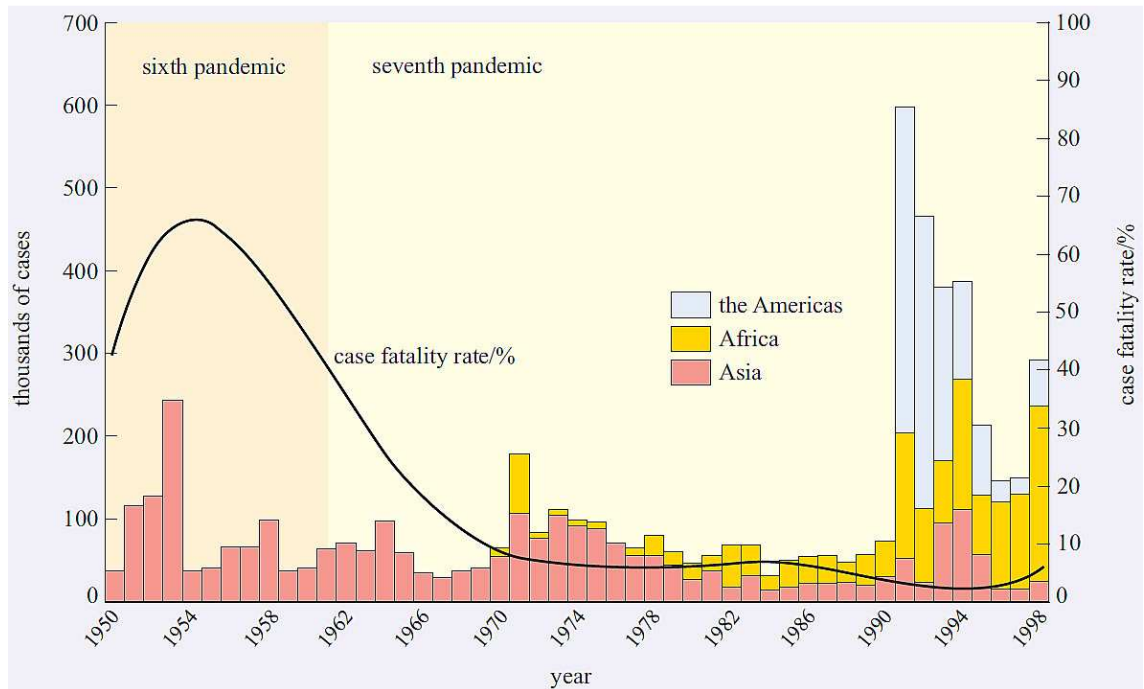


Abbildung 4: Anzahl gemeldeter Cholerafälle und Todesrate 1950-1998. Quelle: Dokument WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1 (25).

Während der sechsten Pandemie in den 1950er Jahren lag die Sterblichkeitsrate bei 50-70 %. In den 1960er Jahren wechselte der Haupterreger von klassischen zum El Tor Biotyp. Die Sterblichkeitsrate sank aufgrund der geringeren Virulenz des Biotyps, wobei die immer besser werdende medizinische Versorgung auch ein Grund dieses Rückgangs war. In Asien und Amerika lag die Sterblichkeitsrate 1998 bei etwa 1 %, die Sterblichkeitsrate in Afrika entsprach mit 5 % der höchsten weltweit.

1.1.3. Infektionsmechanismus

Die Ausbreitung der Cholera-Erreger erfolgt über die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder kontaminiertem Trinkwasser, sowie von Mensch zu Mensch über den fäkal-oralen Infektionsweg (25). Die Bakterien durchqueren die humane Magensäure-Barriere und gelangen in den Dünndarm, den sie besiedeln, sich stark vermehren und beginnen das CT zu sekretieren. Aufgrund der Säuresensitivität von *V. cholerae* ist eine hohe Infektionsdosis von etwa 10^8 Bakterien nötig. Die Infektionsdosis verringert sich auf etwa 10^4 Bakterien bei Personen, die eine reduzierte Magensäureproduktion haben z. B. kleine Kinder (26), ältere Personen oder bei Behandlung mit Antazidum.

Etwa 1-5 Tage nach der Infektion setzen plötzlich wässriger Durchfall und Übelkeit ein. Bis zu 20 l des wässrigen Durchfalls mit 10^9 Bakterien pro Milliliter, auch reiswasserartiger Durchfall genannt, werden täglich von den infizierten Personen ausgeschieden (27).

Zu den entscheidenden Pathogenitätsfaktoren gehören TCP und CT. Diverse Genprodukte in *V. cholerae* gelten nachweislich als Kolonisationsfaktoren des Dünndarms. Dazu gehören TCP (28), akzessorische Kolonisationsfaktoren (ACFs) (29), Mannose-Fruktose-resistentes Hämagglutinin (30), TolC (31), regulatorische Proteine (z. B. ToxR/ToxS, TcpP/TcpH, ToxT) (28, 32, 33), Porine der äußeren Membran (34), biosynthetische Gene der Biotine und Purine (35), ein Eisen-reguliertes OMP (*outer membrane protein*) IrgA (36), das O-Antigen der Lipopolysaccharide (LPS) (37-39), sowie Merkmale der LPS Kern-Region (40). Der wichtigste Kolonisationsfaktor ist TCP, ein Typ IV Pilus. Es konnte gezeigt werden, dass er im Tiermodell und im Menschen für die Kolonisation unerlässlich ist (28, 41). Trotz der entscheidenden Funktion der Kolonisation scheint TCP nicht direkt an die intestinalen Epithelzellen zu binden, viel mehr entstehen durch seine Wirkung Mikrokolonien (Bakterien-Bakterien Interaktionen) auf den Epithelzellen (42). An der Adhäsion an intestinale Epithelzellen müssten demnach andere Faktoren wie Adhäsine oder spezifische mukosale Rezeptoren beteiligt sein.

Der Pathogenitätsfaktor CT, kodiert von *ctxAB*, ruft den heftigen Durchfall hervor. Hierbei handelt es sich um ein Exotoxin, das sich aus zwei Teilen zusammensetzt, der A-Untereinheit mit der Größe 28 kDa, und der B-Untereinheit mit der Größe 12 kDa. Dabei bilden fünf B-Untereinheiten einen Ring, an den die A-Untereinheit bindet (43). In Abbildung 5 ist die Funktionsweise des CTs in der Epithelzelle zu sehen.

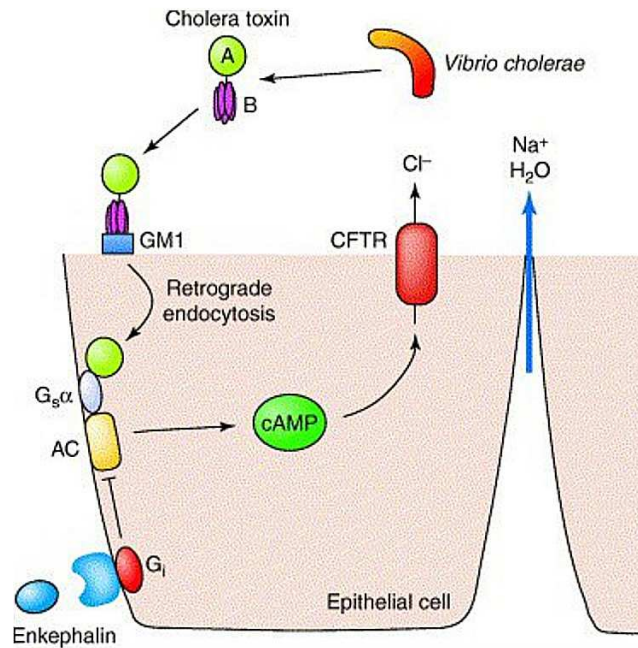


Abbildung 5: Funktionsweise des CTs. Quelle: Thiagarajah und Verkman, 2005 (44).

A, B: Cholera-toxin-Untereinheiten; G_{M1} : Gangliosid-Rezeptor; $G_s\alpha$: G-Protein; AC: Adenylatzyklase; G_i : G-Protein; cAMP: zyklisches AMP; CFTR: „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“.

Die Bakterien sekretieren das CT im infizierten Dünndarm, dieses bindet mit der pentameren B-Untereinheit an die Gangliosid-Rezeptoren (G_{M1}) der Epithelzellen und fördert die Endozytose der A-Untereinheit des Toxins. Die A-Untereinheit interagiert in der Zelle mit dem G-Protein $G_s\alpha$. Dieses Protein aktiviert die Adenylatzyklase, die daraufhin vermehrt cAMP produziert. Durch das hohe cAMP-Level wird CFTR aktiviert und verursacht ein drastisches Ausschleusen von Ionen und Wasser aus den infizierten Enterozyten, was zu den wässrigen Durchfällen führt (44).

1.1.4. Regulation der Virulenzgenexpression in *V. cholerae*

V. cholerae besitzt zwei zirkuläre Chromosomen, das Chromosom 1 mit der Größe 2.961.146 bp und Chromosom 2 mit 1.072.314 bp, die insgesamt 3.885 ORFs enthalten. Der weit überwiegende Teil der nachweislich essentiellen Gene für die Zellfunktionen, z. B. DNA-Replikation, Transkription, Translation und Zellwandbiosynthese, sowie Virulenzgene kodierend für das Toxin, Oberflächenantigene und Adhäsine, befinden sich auf dem größeren Chromosom 1. Die Virulenzgene des CTs *ctxAB*, die Bestandteil des integrierten CTXΦ-Genoms sind, und die TCP kodierenden Gene *tcpABCDEFGHJIJNQRST*, die ein Teil des VPI darstellen, befinden sich allesamt auf dem Chromosom 1. *toxR* ist ein wichtiges regulatorisches Gen der Virulenzgenexpression und befindet sich ebenfalls auf Chromosom 1 (45). Das Vorliegen oder

Fehlen der VPI-Region unterscheidet pathogene und nicht-pathogene Stämme von einander (15).

Der primäre und direkte Transkriptionsaktivator der Virulenzgene ist das Protein ToxT, das zu der großen AraC/XylS Proteinfamilie gehört (46). Mitglieder dieser Proteinfamilie haben eine Domäne aus etwa 100 Aminosäuren gemeinsam, die eine DNA-Bindung fördert und die Transkription aktiviert (47, 48). Ein natürlicher Effektor von ToxT ist die Gallensäure, die die Expression des CTs und TCP reduziert (49). Ebenfalls reduzierend auf die Expression von CT und TCP wirkt das synthetisch hergestellte Molekül Virstatin, das die Dimerisierung von ToxT verhindert (50). In Abbildung 6 ist dargestellt wie ToxT nach der eigenen Expression dimerisiert und einen positiven Expressionseffekt auf TCP und CT ausübt (51).

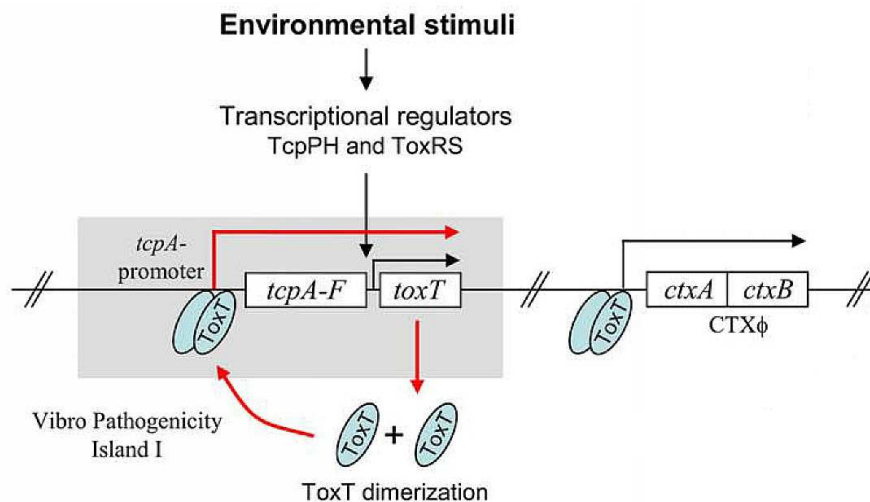


Abbildung 6: Regulation der Virulenzgenexpression durch ToxT. Quelle: modifiziert nach Nielsen et al., 2010 (51).

Der *tcpA* Promotor wird bis *toxT* abgelesen, dabei löst ToxT eine positive Antwortreaktion aus, die zu verstärkter Virulenzgenexpression führt.

Chemische Reize aus der Umwelt induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren TcpPH und ToxRS, die die Expression von *tcpA-F*, *toxT* und *ctxAB* induzieren. Der direkte Transkriptionsfaktor der Virulenzgene ist ToxT, welcher dimerisiert und in seiner Dimerform zu einer positiven Antwortreaktion und einer verstärkten *tcpA-F*- und *ctxA*-Expression führt.

Für einen besseren Überblick der Signaltransduktion ist in Abbildung 7 die ToxT Bindestelle, die *toxbox* dargestellt. Dabei handelt es sich um 13 bp-lange DNA-Sequenzen, die upstream aller bekannten ToxT-aktivierten Gene lokalisiert sind (52).

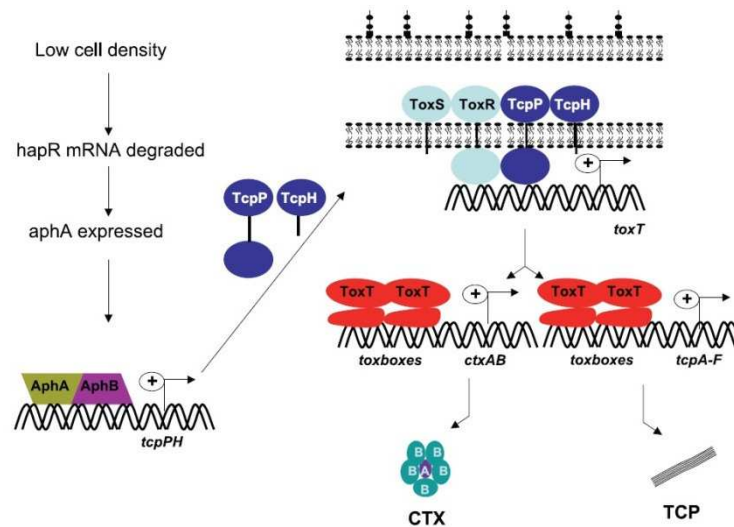


Abbildung 7: Zelldichte-regulierte Signalkaskade zur Expression der Virulenzgene.
 Quelle: Matson et al., 2007 (53).

Der Signaltransduktionsweg der *toxT*-Expression in *V. cholerae*, der sich upstream von *toxT* abspielt, wird oft als ToxR-Regulon bezeichnet. Dieser wurde nach dem ersten positiven Regulator ToxR benannt (29, 54). ToxR agiert mit einem zweiten Transkriptionsaktivator, TcpP. Beide Aktivatoren sind Membran-assoziiert, besitzen eine periplasmatische Domäne, sowie eine zytoplasmatische DNA-Bindedomäne. TcpP benötigt einen weiteren Reaktionspartner, TcpH, und ist an diesem mit der periplasmatischen Domäne gebunden (55). Die Transkription des Operons, das diese beiden Gene enthält, wird durch äußere Signale und Einflüsse wie Temperatur, pH-Wert oder die Produktion von Autoinducern (AI) reguliert (56). Das *toxRS*-Operon wird seinerseits von zwei Aktivatoren reguliert, dem AphA und AphB. Beide Gene sind ebenfalls auf dem großen Chromosom 1 lokalisiert. AphA ist nicht in der Lage, durch Bindung an die DNA die Expression von *tcpPH* zu induzieren. Hierzu nötig ist eine Interaktion mit dem Regulator AphB, der downstream von AphA bindet (57). Diese Interaktion stabilisiert die AphB Bindung an die entsprechende Region und aktiviert den *tcpPH* Promotor. Die Regulation der *toxT*-Expression unterscheidet sich im El Tor und im klassischen Biotyp des O1 Serotyps (58). Der Grund ist zurückzuführen auf den Unterschied eines Basenpaares im *tcpPH* Promotor beider Biotypen, der die Bindefähigkeit von AphB verändert (59, 60). AphA fungiert als Verbindungsprotein der Virulenzgenexpression mit dem Quorum Sensing (QS), einem Mechanismus zur Kommunikation der Bakterien via chemischer Moleküle.

QS ist die Fähigkeit der Bakterien innerhalb einer Art oder auch artübergreifend mit einander zu kommunizieren. Dabei sekretieren Bakterien Moleküle, die dazu beitragen eine Information weiterzugeben. Auf diese Weise kann in einer Bakterienpopulation die Expression bestimmter Gene koordiniert und somit das Verhalten der gesamten

Population gelenkt werden. Mehrere QS-Systeme sind bei *V. cholerae* bereits beschrieben, die parallel ablaufen und verschiedene regulatorische Funktionen haben, z. B. bei der Virulenzgenexpression, der Biofilmbildung und der Protease-Produktion (61, 62). Der zentrale Regulator, den alle Systeme gemeinsam haben, ist HapR, der mit AphA interagiert und somit das QS-System mit der Virulenzgenexpression verbindet (63). Das QS-System 1 ist eine Zweikomponenten Sensorkinase CqsS, die durch den CAI-1 Autoinducer induziert wird. Zum QS-System 2 gehören der Autoinducer AI-2, das periplasmatische Protein LuxP und die Zweikomponenten Sensorkinase LuxQ (64). Die Information beider Systeme wird durch Phosphatübertragung weitergeleitet an den Transkriptionsfaktor LuxO. Ein drittes System enthält das VarS/VarA Sensorkinasenpaar, das die Expression von sRNAs (*small RNAs*), auch Qrr (*quorum regulatory RNAs*) genannt, aktiviert (65). Die Qrr inhibieren das Regulationsprotein CsrA, das seinerseits LuxO aktiviert (62). Dabei handelt es sich um eine indirekte Aktivierung, deren Mechanismus noch unklar ist. In Abbildung 8 ist dargestellt, wie sich die Zelldichte einer Population auf das QS auswirkt.

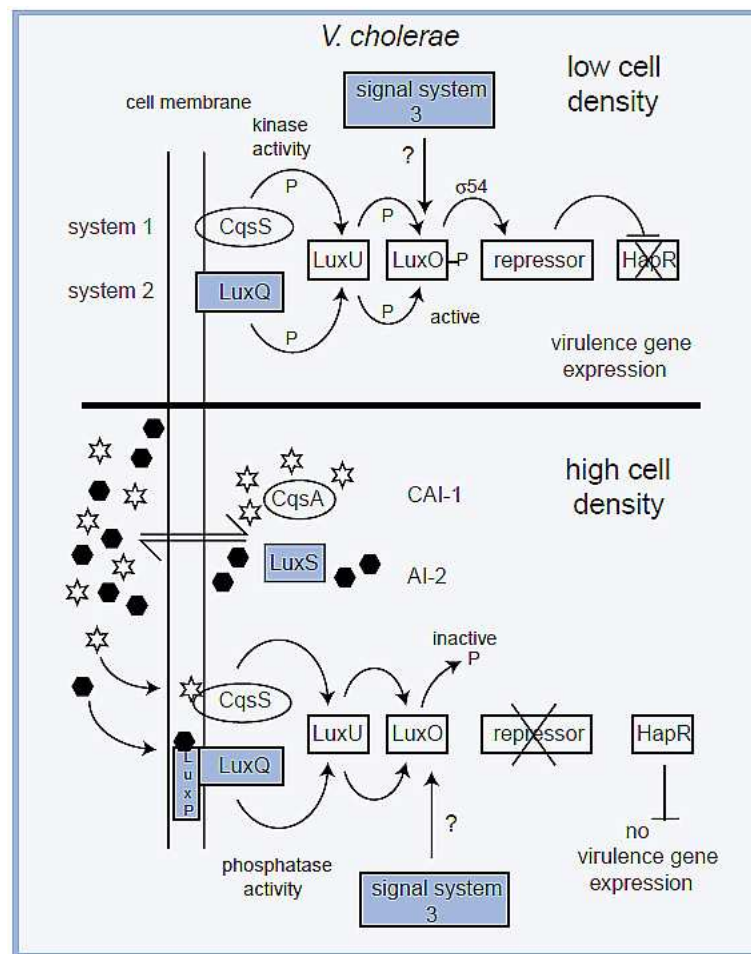


Abbildung 8: Quorum Sensing in *V. cholerae*. Quelle: Camara et al., 2002 (66).

Die geringe Zelldichte einer *V. cholerae* Population führt zu einer geringen Autoinducer-Konzentration. LuxU wird darauf durch die Sensorkinasen CqsS und LuxQ phosphoryliert und überträgt seinerseits die Phosphatgruppe weiter auf LuxO (67, 68). Das phosphorylierte LuxO aktiviert die Expression von vier regulatorischen sRNAs namens Qrr1-4 (69, 70). Qrr1-4 und das Chaperon Hfq binden gemeinsam an die *hapR* mRNA und destabilisieren sie hierdurch. Bei einer geringen Zelldichte wird also nur wenig HapR Protein gebildet. Bei einer hohen Zelldichte steigt die Autoinducer-Konzentration, CqsS und LuxQ fungieren in diesem Fall als Phosphatasen, was zu einer Dephosphorylierung von LuxO führt. Die inaktive Form von LuxO führt zum Expressionsstop von Qrr1-4. Das *hapR* Gen kann exprimiert und zum HapR translatiert werden. HapR reguliert die Expression diverser Gene. Es reprimiert direkt die *aphA*-Expression und reduziert die Virulenzgenexpression (63). Bei einer hohen Zelldichte reprimiert das HapR Protein seine eigene Expression, wobei die Signifikanz dieser Autorepression bislang noch nicht geklärt werden konnte (71).

Während das QS in einer Vielzahl von *Vibrio* Arten eine wichtige Funktion übernimmt, sind einige *V. cholerae* Stämme z. B. der pathogene N16961 El Tor Stamm, der eine Frameshift-Mutation im *hapR* Gen trägt, nicht in der Lage auf den sensorischen Input zu reagieren (72). Daher scheint das QS-System nicht der einzige Regulationsweg der Virulenz in *V. cholerae* zu sein.

1.1.5. Pharmakologische Möglichkeiten zur Behandlung bzw. Prävention von *V. cholerae* Infektionen

Cholera ist im Prinzip eine einfach zu behandelnde Erkrankung. Bis zu 80 % der erkrankten Personen können erfolgreich durch die schnelle Zufuhr einer oralen Rehydratisierungslösung behandelt werden. Von der WHO empfohlen wird dafür eine Trinklösung, die Glukose, Natriumcitrat, Natriumchlorid und Kaliumchlorid enthält. Bei schweren Krankheitsverläufen wird empfohlen, diese Lösung intravenös zu verabreichen, um den entzündeten Magen-Darm Trakt zu umgehen. Neben der intravenösen Rehydratisierungstherapie werden aber auch Antibiotika eingesetzt z. B. Tetracyclin und Furazolidon. Die Kombinationstherapie der Rehydratisierung mit Antibiotika verkürzt die Dauer der Erkrankung um etwa 50 %, lindert die Schwere der Symptome z. B. das Durchfallvolumen, reduziert hierdurch die benötigte Menge an der lebensnotwendigen Rehydratisierungslösung und die Menge der ausgeschiedenen Erreger in die Umwelt (73-75). Besonders in Dritte Welt Ländern, wo eine Knappheit an sauberem Trinkwasser herrscht, und ein Mangel an der Rehydratisierungslösung vorliegt, ist diese Kombinationstherapie von großem Nutzen. Durch eine schnelle Behandlung wird die Sterblichkeitsrate auf unter 1 % reduziert.

Wichtige Maßnahmen zur Bekämpfung von Cholera sind weiterhin die Prävention der Infektion durch Hygienemaßnahmen und durch Impfung. Auf dem Markt erhältlich sind zwei Medikamente zur Prävention von Cholera. Dukoral® ist zugelassen in über 60 Ländern. Der orale, inaktivierte Impfstoff enthält zwei wichtige Komponenten für den Aufbau des Schutzes gegen Cholera-Infektionen. Ein Bestandteil ist die B-Untereinheit des CTs, die im Darm die Bildung von spezifischen Antitoxin-Antikörpern induziert. Zweiter Bestandteil sind inaktivierte *V. cholerae* Bakterien des O1 Serotyps, die im Darm die Bildung von antibakteriellen Antikörpern induzieren. Die Ausbildung der antibakteriellen und antitoxischen Immunität führt aufgrund von Synergieeffekten zu Schutzraten von bis zu 90 % gegen Cholera (76). Beim zweiten oral einzunehmenden Impfstoff handelt es sich um Shanchol®, das aus inaktivierten *V. cholerae* Bakterien besteht und einen bis zu 50 %igen Schutz gegen die Serotypen O1 und O139 bietet (23). Beide Impfungen haben nur eine begrenzte Wirkdauer und müssen regelmäßig aufgefrischt werden. Aufgrund der hohen Kosten können diese Impfstoffe in von Cholera betroffenen Gebieten bisher nicht prophylaktisch eingesetzt werden.

Antibiotikaresistenzen

Zur Behandlung von Cholera sind Antibiotika nicht zwingend notwendig und können auch nicht als alleinige Therapie angewandt werden. Das gängige Antibiotikum ist Tetracyclin, das im Fall von Infektionen mit Tetracyclin-resistenten Stämmen durch Erythromycin, Furazolidon oder einer Kombination von Trimethoprim-Sulfamethoxazol ersetzt wird (77). Bei besonders schweren Krankheitsverläufen bietet es sich an, die Wasser- und Elektrolyt-Ersatztherapie mit der Antibiotika-Einnahme zu kombinieren.

Seit den späten 1950ern wurden weltweit extensiv Antibiotika eingesetzt, unter anderem auch das Furazolidon (Furoxon) (78). 30 Jahre später, in den späten 1980ern, entwickelten nahezu alle enterisch pathogenen Mikroorganismen Resistenzen gegen dieses Antibiotikum, was den weiteren Einsatz drastisch limitiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass *V. cholerae* des O1 Serotyps, die 1938 bis 1993 weltweit untersucht wurden, gegen 1 von 3 Antibiotika eine Resistenz trugen. Von 1994 bis 2005 isolierte Stämme trugen bereits Resistenzen gegen Tetracyclin, Nalidixinsäure, Furazolidon, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Ciprofloxacin (79). Dieser Trend macht viele der bekannten Antibiotika wirkungslos im Einsatz gegen bakterielle Infektionen und schafft einen Mangel an wirksamen Substanzen. Die auftretenden Resistenzen können verschiedene Ursachen haben, z. B. bakterieller Einsatz von Efflux-Pumpen, die die Antibiotika aus der Zelle herausschleusen (80). Eine weitere Ursache ist die Entstehung spontaner Mutationen des bakteriellen Chromosoms. Von Resistenzen gegen den Zellwandbiosynthese-Inhibitor Alafosfalin und DNA-Replikationsinhibitoren aus der Familie der Quinolone durch spontane Mutationen,

wurde ausführlich berichtet (81-84). Die Ausbreitung antibiotischer Resistenzen bei *V. cholerae* kann auch über horizontalen Gentransfer, via selbst-übertragbarer mobiler DNA-Elemente erfolgen. Ein Beispiel sind die SXT-Elemente, die zu der Gruppe der ICEs (*integrative conjugating elements*) gehören und zuerst in *V. cholerae* Serogruppe O139 beschrieben wurden (85). Die SXT-Elemente können Gene enthalten, die dem Wirtsbakterium Resistenzen gegen Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Streptomycin bieten (85). Inzwischen werden weltweit *V. cholerae* O1 und O139 Serotypen isoliert, die SXT-Elemente über eine natürliche Ausbreitung erlangt haben (86, 87). Eine konjugative Plasmidübertragung von Bakterium zu Bakterium führt ebenfalls zur Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen. Aufgrund des hohen Einsatzes von Tetracyclin entwickelten sich auf diesem Wege Tetracyclin-resistente Stämme (73). Einer der ersten beschriebenen *V. cholerae* Stämme, resistent gegen Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol, wurde etwa 1970 im Süden der UdSSR isoliert. Die Resistenzen konnten auf *E. coli* K-12 übertragen werden, demnach befanden sie sich auf einem Plasmid (88). Der 1979 Cholera-verursachende Stamm in Bangladesch trug ein Plasmid mit Resistenzen gegen Tetracyclin, Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Gentamycin und Trimethoprim. Im Labor war die Übertragung des Plasmids auf andere Bakterienarten, unter anderem auch auf *E. coli*, möglich (89).

1.2. Wirkstoffforschung mittels Hochdurchsatz-Screening-verfahren

Hochdurchsatz-Screeningverfahren haben in den letzten drei Jahrzehnten eine bedeutsame Rolle bei der Identifizierung von Wirkstoffen eingenommen (90). Mittels dieser Verfahren wird unter möglichst geringer Aufwendung von Kosten und Zeit eine große Anzahl von Substanzen parallel untersucht (Screening), und dabei werden Moleküle identifiziert (Hits), die im adressierten biologischen Kontext die gesuchte Wirkung haben. Die Bezeichnung Hochdurchsatz-Screening (HTS) wird verwendet wenn in einem Testverfahren mehrere tausend, zehntausend oder mehrere hunderttausend Substanzen untersucht werden. Insbesondere in der Pharmaindustrie werden durch entsprechende Automatisierungstechniken einige 10.000 Verbindungen pro Tag auf ihre Wirksamkeit getestet. Werden pro Tag mehr als 100.000 Substanzen getestet, wird auch der Begriff Ultra-Hochdurchsatz-Screening (uHTS) verwendet (91). Durchgeführt werden solche Screenings in 384-Well- und 1536-Well-Mikrotiterplatten (MTP).

1.3. Ziele der Arbeit

Das Projekt war eine Kooperation des HZI mit dem National Institute of Cholera and Enteric Diseases in Kalkutta, Arbeitsgruppe Dr. Ranjan Nandy, und wurde finanziert von Indo-German Science Centre for Infectious Diseases. Das Hauptziel der Arbeit war

die Identifizierung von neuen Substanzen, die das Wachstum von pathogenen *V. cholerae* Stämmen generell inhibieren oder spezifische Wirkung gegen die Pathogenitätsfaktoren zeigen. Um das Hauptziel zu erreichen, wurden vier verschiedene Assays entwickelt und etabliert, die die Möglichkeit bieten, in einem Hochdurchsatz-Screeningverfahren im 96- oder 384-Well-MTPn Format nach aktiven Substanzen zu suchen.

1. Im Wachstumsassay sollte mit Hilfe eines vom indischen Kooperationspartner zur Verfügung gestellten GFP-exprimierten Reporterstamms nach neuen gegen *V. cholerae* antibakteriell wirkenden Substanzen gescreent werden. 2. Beim Cholera-toxin-Assay wurde für das Screening ein weiterer vom indischen Kooperationspartner zur Verfügung gestellter Reporterstamm eingesetzt. In diesem Fall sollte explizit nach Substanzen gesucht werden, deren Target sich im Quorum Sensing Signalweg befindet, und auf diesem Weg die Expression der Virulenzgene vermindern. 3. Bei dem PPO-Assay handelt es sich um einen Enzym-Aktivitätsassay mit der für die Bakterien essentiellen Protoporphyrinogen IX Oxidase. Bei dem Screening sollte nach Substanzen gesucht werden, die die Enzymaktivität und somit die Vitalität der Bakterien reduzieren. 4. In einem weiteren Ansatz sollte ein zellbasierter Adhäsionsassay etabliert werden. Hierbei lag der Fokus auf der Adhäsion der Bakterien an die eukaryotischen Zellen und der Suche nach adhäsionsvermindernden Substanzen.

Unter Anwendung der oben genannten Assays sollten anschließend verschiedene Substanzsammlungen sowie Peptidbibliotheken gescreent werden. Die identifizierten Wirkstoffkandidaten sollten nachfolgend in weiterführenden Tests näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung, Hersteller und Firmensitz

Gerät	Modell	Hersteller (Firmensitz)
Autoklav	HST 4-5-6	Zirbus (Bad Grund)
Automatisches Mikroskop	ImageXpress Micro	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Bakterieninkubator	BE 50	Memmert (Schwabach)
Einkanal-Pipetten	Research and Reference	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese-Apparaturen	High Voltage Power Pack P30	Biometra (Göttingen)
	Fastblot B33 / B34	
	Blue Marine 100	
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad (München)
Filmentwickler	Curix60	Agfa (Mortsel, Belgien)
Gelgießkammer	Mini-Protean® System	BioRad (München)
Genome Analyzer	Analyzer IIx mit Paired-End Modul	Illumina (San Diego, USA)
Heizplatte / Magnetrührgerät	IKAMAG® RCT	IKA-Labortechnik (Staufen)
HPLC-Geräte		Merck (Darmstadt)
Autosampler	L-7250	
Pumpe	L-7100	
Interface	D-7000	
Fraktionssammler	L-7650	
Cluster Station		Illumina (San Diego, USA)
Laserscanner	Perfection V700 Photo	Epson (Tokyo, Japan)
Lichtmikroskop	Axiovert 35	Zeiss (Oberkochen)
Mehrkanalpipetten	Transferpette electronic	BRAND GmbH + CO KG (Wertheim)
Mikrowelle	NE-1 840	Panasonic (Osaka, Japan)
Multi-Dispenser Pipette	Impact Multichannel	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PCR-Cycler	PTC-200	MJ Research (Waltham, USA)
	LightCycler® 480	Roche (Mannheim)
pH-Messgerät	pH-Meter CG 840	Schott (Mainz)

Material und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller (Firmensitz)
Photometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	Ultraspec 2100 pro	Pharmacia (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)
Pintool (zusammen mit Pipettierroboter eingesetzt)	FP3CB Pins: Floating Tube Pin - 0,787mm Durchmesser, 33 mm lang, Übertragungsvol. ca. 80 nl	V&P Scientific, Inc. (San Diego, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipettierroboter	Evolution P3	PerkinElmer (Waltham, USA)
Plattenmessgeräte	Wallac Victor 1420 Multilabel counter	PerkinElmer (Waltham, USA)
	Fusion Universal Microplate Analyzer	PerkinElmer (Waltham, USA)
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore (Eschborn)
Schüttel- und Mischgerät	Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)
	Titramax 1000	Heidolph (Schwabach)
Schüttelinkubator	Multitron	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean® Tetra Cell	BioRad (München)
Sterilwerkbänke	Herasafe KSP	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	HBB2472S	Heraeus (Hanau)
	SterilGARD III Advance	Baker Company (Sanford, Maine, USA)
Thermomixer	comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschrank (-80)	Ultralow MDF-U50V	Sanyo (München)
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin (Berlin)
Vakuumabsaugpumpe	Vacusaft comfort	Integra Biosciences (Fernwald)
Vakuum-Zentrifuge	Univapo 150 H	UniEquip GmbH (Martinsried)
Vortexer	Reaxtop	Heidolph (Schwabach)
Waagen	Präzisionswaage L420S	Sartorius (Göttingen)
	R160P	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	SUB 14 mit Deckel Lu14	Grant (Shepreth, UK)
Zählkammer	Neubauer improved	Assistent (Sondheim)
Zellinkubator	CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus (Hanau)
	CO ₂ -Air-Jacketed Incubator	Nuaire (Plymouth, USA)
Zentrifugen	Sorvall RC 5C Plus	Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, USA)
	5810R, 5418 und 5415R	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 3.0 R	Heraeus (Hanau)

Automatisches Mikroskop, die Ausstattung

Eingesetztes Modell: ImageXpress Micro (IXM) von Molecular Devices

High-Speed Laser Autofokus

Digitale CCD (*Charge-Coupled Device*) Kamera

300 Watt Xenon-Bogenlampe

Filter Sets: DAPI, FITC, TRITC, Texas Red

Nikon Objektive: 4X Plan Apo, NA (Numerische Apertur) 0,20

10X S Fluor, NA 0,50

20X S Fluor, NA 0,75

40X Plan Apo, NA 0,95

60X Plan Fluor, NA 0,85

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz

Produkt	Lieferant (Firmensitz)
Bicinoic acid (BCA)-Proteintest	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bilirubin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Choleratoxin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
GeneRuler 1 kb Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler Express DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Kodak® BioMax™ light film	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Loading Dye, 6x Konz.	Fermentas (St. Leon-Rot)
Mikrotiterplatten: MaxiSorp® 96 Wells pro Platte, durchsichtig, für den G _{M1} -ELISA	Nalgene Nunc (Rochester, USA)
Mikrotiterplatten: 384 Wells pro Platte, durchsichtig, für die Wachstumsexperimente	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Mikrotiterplatten: 96 Wells pro Platte, durchsichtig, für die Wachstumsexperimente	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Mikrotiterplatten: Polystyrol, 96 Wells pro Platte, schwarz, durchsichtiger Boden, für die Adhäsionsexperimente	Nalgene Nunc (Rochester, USA)
Monosialogangliosid (G _{M1})	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Dassel)
OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride) Tabletten, 10 mg pro Tablette	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Petrischalen ohne Nocken, 94 x 16 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Produkt	Lieferant (Firmensitz)
Polypropylen-Abdeckfolie für Mikrotiterplatten	HJ-Bioanalytik (Mönchengladbach)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BioRad (München)
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	BioRad (München)
Protoporphyrin IX	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen (Hilden)
RNaseZap®	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Kulturröhrchen 13 ml, 100 x 16 mm	Sarstedt AG (Nümbrecht)
Roti®-Load 1, 4x Konz.	Carl Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter: MF75 Bottle-Top-Filter, 0,2 µm PES	Fisher Scientific (Schwerte)
Sterilfilter: Whatman GD/X Syringe Filter , 0,2 µm PES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.3. Kits

Tabelle 3: Kits unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz

Name des Kits	Lieferant
Agilent's Low Input Linear Amplification Kit, zur Transkriptomanalyse bei <i>V. cholerae</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, USA), durchgeführt am NICED
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
Genomic DNA Sample Prep Kit	Illumina (San Diego, USA)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche (Mannheim)
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Proto Script® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit	New England BioLabs (Ipswich, USA)
RNase-Free DNase-Set	Qiagen (Hilden)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.4. Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Alexis Biochemicals, Becton-Dickinson, Fluka, Geyer, Gibco, Invitrogen, J.T. Baker, Merck, Oxoid, Riedel-de-Häen, Roche Diagnostics, Roth oder Sigma bezogen.

2.1.5. Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 4: Antikörper bzw. Farbstoff mit Lieferant

Antikörper bzw. Farbstoff	Lieferant
Alexa Fluor® 488 Anti-Maus-AK (aus Kaninchen)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Anti-Cholera-toxin-AK (aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-His-AK (aus Maus)	Merck (Darmstadt)
Anti-RecA-AK von <i>E. coli</i> (aus Kaninchen)	Bio Academia (Osaka, Japan)
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Merck (Darmstadt)
Hoechst 33342	Invitrogen (Carlsbad, USA)
HRP konjugierter AK Anti-Kaninchen (aus Ziege)	Dako (Hamburg)
HRP konjugierter AK Anti-Kaninchen (aus Ziege)	Dianova (Hamburg)
HRP konjugierter AK Anti-Maus (aus Kaninchen)	Dako (Hamburg)

2.1.6. Kulturmedien

Zur Kultivierung von *S. aureus* wurden verschiedene Medien eingesetzt, die alle in folgender Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 5: Medien für die Kultivierung von *V. cholerae*, *E. coli* und anderen Bakterien

Medium	Komponenten bzw. Hersteller
AKI	pH 7,4, 15 g/l Pepton, 4 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, 4 g/l NaHCO ₃
LB (Luria-Bertani)	pH 7,0, 25 g/l (BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
MH (Müller-Hinton)	pH 7,2-7,4, 21 g/l (Carl Roth, Karlsruhe)
spezifisches Medium für <i>A. baumannii</i>	pH 7,0, 5 g/l Pepton, 3 g/l Fleisch-Extrakt

Alle Medienkomponenten wurden in deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert bzw. steril filtriert. Festen Medien wurden jeweils 15 g Agar pro Liter Medium zugesetzt.

Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/ml und Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Bei festen Medien wurden Antibiotika und andere Substanzen unmittelbar vor dem Gießen der Agarplatten, bei einer Temperatur des Agarosemediums von ≤ 40 °C zugesetzt.

Als Zellkulturmedium wurden DMEM (Lonza, Basel, Schweiz) verwendet, dem 10 % FBS (Lonza, Basel, Schweiz) zugesetzt wurde.

2.1.7. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Rezeptur bzw. Firma
Blot-Transferpuffer (Western Blot)	pH 8 - 10,5, 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Methanol; 0,1 % SDS
Citrat Puffer (G _{M1} -ELISA)	pH 4,5, 0,047 mM Zitronensäure, 0,053 Natriumcitrat 2H ₂ O
Coomassie-Färbelösung (SDS-PAGE)	0,1 % Coomassie R250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol
EBSS (Zellkultur)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Elutionspuffer (Proteinaufreinigung)	Lysepuffer pH 7,5, 250 mM Imidazol oder 500 mM Imidazol
Entfärbelösung (SDS-PAGE)	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure
Laufpuffer (SDS-PAGE)	pH 8,3 - 8,8, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Lysepuffer (Proteinaufreinigung)	pH 7,5; 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin
PBS (ELISA)	pH 7,2; 136,89 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 2,68 mM KCl
PBS (Wachstumsassay, CT-Assay, Adhäsionsassay)	pH 7,4, 15 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, 85 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20
PPO-Assay Puffer	pH 7,6, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM Glutathion, 0,3 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl
Proto'gen Puffer	pH 7,5, 20 mM Tris, 10 mM DTT, 10 mM KOH
TAE (Gelelektrophorese)	pH 7,4, 40 mM Tris, 3 mM EDTA
TE (RT-PCR)	pH 7,4, 10 mM Tris, 1 mM EDTA
TBS (zur Behandlung der Blot Membran)	pH 7,0; 150 mM NaCl, 7,7 mM Tris-HCl
TBST (zur Behandlung der Blot Membran)	TBS pH 7,0, 0,05 % Tween 20
Waschpuffer I – IV (Proteinaufreinigung)	Lysepuffer pH 7,5, 10 mM Imidazol (I) bzw. 20 mM (II) bzw. 50 mM (III) bzw. 100 mM (IV) Imidazol

2.1.8. Mikroorganismen und Zellkulturen

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt:

Tabelle 7: Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Ursprung		
		Spezies	Gewebe	Art
IPEC-J2	Peter Schierack, Freie Universität Berlin	Ferkel	Darmschleimhaut	Epithel
L929	Florenz Sasse, HZI	Maus	Bindegewebe	Fibroblast

Die verwendeten *V. cholerae* Stämme sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: *V. cholerae* Wt- und Reporterstämme

Bezeichnung	Serotyp / Biotyp	enthaltene Plasmid	Quelle (erhalten von)
CM-2	O1, El Tor		Carsten Matz (HZI)
MO10 pAKSB	O139	pAKSB	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
MO10 pG13	O139	pG13	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
N16961	O1, El Tor		Dr. Ranjan Nandy (NICED)
NM06-058	O1, El Tor		Dr. Ranjan Nandy (NICED)

Weitere pathogene Keime, die in dieser Arbeit für MHK- und MBK-Bestimmungen verwendet wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Pathogene Keime

	Bezeichnung	Quelle (erhalten von)
Gram –	<i>A. baumannii</i> , ATCC 30007	DSMZ
	<i>E. coli</i> , ESBL, 5044257621-1	Dr. Werner Tegge (HZI)
	<i>E. coli</i> , ETEC	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
	<i>K. pneumonia</i> , 50219455	Dr. Werner Tegge (HZI)
	<i>P. aeruginosa</i> , 90013687	Dr. Werner Tegge (HZI)
	<i>S. typhimurium</i>	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
	<i>S. boydii</i>	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
	<i>S. flexneri</i>	Dr. Ranjan Nandy (NICED)
Gram +	<i>E. faecalis</i> , ATCC 20212	Dr. Werner Tegge (HZI)
	<i>S. aureus</i> , N315, MRSA	Dr. Werner Tegge (HZI)

Für die Klonierungsarbeiten wurden die *E. coli* Stämme DH5α und BL21(DE3) verwendet.

2.1.9. Testsubstanzen

Sekundärmetabolite aus Myxobakterien (NCH-Sammlung): Die in dieser Arbeit eingesetzten 146 Substanzen waren in der Abteilung Naturstoffbiologie des HZI im Rahmen von über viele Jahre durchgeführten Forschungsarbeiten aus Myxobakterien isoliert worden. Sie lagen als 2 mM Stammlösungen in DMSO in zwei 96-Well Polypropylen-Mikrotiterplatten vor.

VAR-Sammlung: Die Sammlung beinhaltet zahlreiche unterschiedliche Strukturen, die durch Kollaboration mit verschiedenen Synthese-Chemikern in die HZI-

Substanzsammlung aufgenommen wurden. Zur Zeit der Screening-Experimente dieser Arbeit standen ca. 2.900 Substanzen in dieser Sammlung zur Verfügung. Die Stammlösungen wiesen eine Konzentration von 5 mM in DMSO auf, mit Ausnahme von Screeningplatte 1, in der Konzentrationen von 1,0 mg/ml und 1,3 mM vorlagen. Alle Substanzen dieser Sammlung befanden sich in 96-Well-Polypropylenplatten.

Peptidbibliotheken: Die drei im Folgenden aufgeführten Peptidbibliotheken bestanden jeweils aus 361 Subbibliotheken mit jeweils definierten Aminosäuren an den Positionen „1“ und „2“. Sie waren in der Abteilung Chemische Biologie des HZI im Rahmen von Forschungsprojekten durch chemische Synthesen erzeugt worden. Die Strukturen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Positionen „X“ sind jeweils nicht definiert und enthalten alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein, so dass jede Subbibliothek folglich ein Peptid-Gemisch diverser Abfolgen enthält. Die linearen Peptide tragen einheitlich C-terminal den Diketopiperazin-Heterozyklus (DKP) als Kondensationsprodukt der Aminosäuren Lysin und Prolin. Die Peptide lagen in einem 2-Propanol/H₂O Gemisch (1:1) in jeweils vier 96-Deepwell-Polypropylenplatten vor.

Tabelle 10: Peptidbibliotheken

Peptidbibliothek	Konzentration der Stammlösungen
Lineare Peptide mit der Struktur X-X-X-1-2-X-X-X-DKP aus L-Aminosäuren	4,0 mM
Lineare Peptide mit der Struktur X-X-X-1-2-X-X-X-DKP aus D-Aminosäuren	2,2 mM
Zyklische Peptide mit der Struktur [a-a-1-2-a-a-c] aus D-Aminosäuren	3,5 mM

LOPAC-Sammlung: Diese Sammlung ist kommerziell bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erhältlich und besteht aus 1408 pharmakologisch aktiven Substanzen. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 10 mM in DMSO, diese Stammlösungen befanden sich in vier 384-Polypropylen-Mikrotiterplatten.

EMC-Sammlung: Diese Sammlung besteht aus 7.200 Substanzen und ist erhältlich bei der Firma EMC microcollections GmbH (Tübingen).

CDI-Sammlung: Diese Sammlung besteht aus etwa 17.000 organischen Verbindungen und ist erhältlich bei der Firma Chemical Diversity Lab, Inc. (San Diego, USA).

Weitere Informationen zu den Sammlungen sind unter 3.1.2 aufgeführt.

2.1.10. Primer

Die *in silico* erstellten Primeren zur DNA-Synthese für die rekombinante Proteinsynthese wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Tabelle 11: Primer

Oligoname	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsenzym
aphA-5'-Primer	AACCGTGCGTGATGAGTTTA	
aphA-3'-Primer	GGTAAGGTTCTGCCGATTGT	
ctxA-5'-Primer	CCTCCGGAGCATAGAGCTT	
ctxA-3'-Primer	CTTGGAGCATTCCCAAC	
hemG.mitHis.forw.	CGGCCTATCATATG GTGAAAGCGTTACTGTTGTACTC	NdeI
hemG.oHis.rev.	CCTGCTGCC AAGCTTCTACCAATTGCGGAATTGT	HindIII
hemG.oHis.forw.	GCATCTAT CCATGGCGTGAAAGCGTTACTGTTGTACTC	NcoI
hemG.mitHis.rev.	GGTCGTGCC GTGACCCAATTGCGGAATTGTT	Sall
recA-5'-Primer	TGCTCTGGATATCGCGTTG	
recA-3'-Primer	GGCCGAAGATCTCAACGAT	
T7-Promoter-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator-Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
tcpA-5'-Primer	TTGGTCAGCCTTGTAAGGT	
tcpA-3'-Primer	CCCCATAGCTGTACCAGTGAA	

2.1.11. Expressionsvektor

Für die Expression wurde der Vektor pET33b(+) von Novagen (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

2.1.12. Enzyme

Tabelle 12: Enzyme

Enzym-Bezeichnung	Firma
DNase I	Roche (Mannheim)
Lysozym	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Proteinase K	Qiagen (Hilden)
Restriktionsenzym HindIII	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzym NcoI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzym NdeI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzym Sall	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase (aus <i>E. coli</i> NM 989 acc. to Murray)	Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)

2.1.13. Software

Tabelle 13: Software

	Verwendungszweck
AcuityXpress	Software zur Bildanalyse der IXM-Aufnahmen
CorelChart Version 5.0	zweidimensionale Farbintensitäts-Darstellung („Thermogramm“) der Adhäsionswerte (Teil des Programmpakets Corel Draw bis zur Version 5)
GeneSpring GX 11.0	Software zur Auswertung der Transkriptomanalyse, Transkriptomanalyse und Auswertung wurden durchgeführt am Niced
Genome Analyzer Pipeline Analysis Software 1.8	Software zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen bei der Paired-End Sequenzierung
ImageJ	Software zur Detektion der Bandenintensität der entwickelten Western Blots auf Fotofilm
LightCycler® 480 Software	Software zur Bedienung des LightCycler® 480 und die Auswertung der Messungen
MetaXpress	Software zur Steuerung des IXM
Microsoft Office Excel 2007	Graphische Darstellung der Adhäsionswerte und der MTT-Tests, Auswertung und Darstellung der Daten, die mittels des Transfluor-Moduls von MetaXpress erstellt wurden
Next Generation Sequencing tool CLC Genomics Workbench V. 4.7.2 Software	Software zur Kalkulation der SNPs und DIPs bei der Genomsequenzierung
Vector NTI®	Erstellung und Überprüfung der Klonierungsstrategie

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien

Kultivierung

Für die Standardkultivierung von *V. cholerae* und *E. coli* auf festem Medium wurden LB-Agarplatten verwendet. Der Reporterstamm MO10 pG13 wurde auf LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin, MO10 pAKSB auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin kultiviert.

Für die Durchführung aller Assays wurde *V. cholerae* in Flüssigmedien angezogen. Für den Wachstums- und Adhäsionsassay wurden 5 ml LB-Vollmedium mit einigen Kolonien einer bewachsenen LB-Agarplatte beimpft und ü. N. bei 37 °C geschüttelt. Für den CT-Assay wurde das AKI-Medium verwendet.

E. coli wurde für die Klonierungs- und Expressionsversuche im LB-Medium mit Zusatz von Antibiotika kultiviert.

Alle Inkubationsschritte erfolgten unter aeroben Bedingungen.

Lagerung

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 500 µl LB-Flüssigkultur (24 h, 37 °C, 180 rpm) mit dem gleichen Volumen sterilem ≥ 86 %igem Glycerin gemischt und in Kryoröhrchen bei -70 °C gelagert.

KBE-Bestimmung

Für die KBE-Bestimmung (Kolonie bildende Einheiten) wurden die Bakteriensuspensionen mittels Verdünnungsreihen dezimal bis maximal 10^{-12} verdünnt. Von den so angefertigten Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert, ü. N. bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Dafür wurden die entstandenen *V. cholerae* Kolonien auf den LB-Agarplatten ausgezählt und damit die KBE/ml Kultur berechnet.

2.2.2. Arbeiten mit Zellkulturen

Kultivierung

Für alle Zellkulturarbeiten wurden die benötigten Medien vor Arbeitsbeginn auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ unter Wasserdampfsättigung in Zellkulturflaschen kultiviert. Es wurde mit Zellkulturflaschen gearbeitet, die eine Wachstumsfläche von 25 cm² und ein Fassungsvermögen von 10 ml Medium hatten. Die adhärennten Zellen wurden subkonfluent (~ 80-90 % Konfluenz) geerntet und passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden des Gefäßes gekratzt und die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen Einmalplastikpipette durchmischt und vereinzelt. Anschließend wurde ein Aliquot in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Trypsinierung: Zum Vereinzeln der Zellen vor dem Auszählen wurden die Zellen trypsinisiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 10 ml sterilem EBSS gewaschen, 1 ml einer 1 %igen Trypsin-Lösung wurde mehrmals über den gesamten Flaschenboden gegeben und bis auf einen dünnen Film wieder abpipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit bei 37 °C für ca. 5 min, bis sich die Zellen deutlich sichtbar vom Boden ablösten. Anschließend wurden diese in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt.

Die Zelllinie wurde maximal 1 Jahr in Kultur gehalten. Halbjährlich wurde sie mithilfe des MycoAlert® Detection Kits auf Mycoplasmen getestet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, jedoch adaptiert auf 384-Well-MTPs mit $\frac{1}{4}$ der angegebenen Volumina.

Lagerung

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation (3.000 rpm, 3 min) pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Lagerung erfolgte im Kryoröhrchen bei -70 °C für mindestens 24 h, dann dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zum Reaktivieren einer Kryokonserven der IPEC-J2 oder L929-Zellen wurde die Zellsuspension schnell bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Nach spätestens einem Tag wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt, um das DMSO des Einfriermediums vollständig zu entfernen.

Vitalitätstest

Für die Vitalitätstests wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und mit 200.000 oder 50.000 Zellen pro Well (in 120 µl) in die Reihen B-G einer 96-Well-MTP gegeben. Die Reihen A und H wurden nur mit Medium befüllt. In eine andere 96-Well-MTP wurden in jedes Well 150 µl Medium gegeben und in Spalte 1 zusätzlich 75 µl der zu untersuchenden Probe (zwei Proben in Doppelbestimmung und Lösemittelkontrolle). Es erfolgte eine serielle Verdünnung mit 75 µl (Verdünnung 1:3) von links nach rechts. Aus dieser Probenplatte wurden dann je 60 µl in die gleichen Wells der ersten Mikrotiterplatten (mit 200.000 und 50.000 Zellen pro Well) transferiert. Nach einer 24-stündigen bzw. 5-tägigen Inkubation wurde ein MTT-Test durchgeführt.

Der MTT-Test erfolgte mit leichten Veränderungen nach Mosmann [1983]. Es wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen und der Rückstand in 100 µl eines Isopropanol-HCl-Gemisches (100 ml 2-Propanol mit 400 µl konz. HCl) gelöst und photometrisch bei 595 nm in einem MTP-Photometer vermessen.

Die Ergebnisse wurden mit Excel dargestellt und die Konzentration, bei der die Zellvitalität um 50 % reduziert war, als IC₅₀-Wert definiert.

2.2.3. Wachstumsassay: Screening und Evaluierung der Hits

Screening: Zugabe der Substanzen

Der *V. cholerae* Reporterstamm MO10 pG13 wurde in einer ü. N. Vorkultur im LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Für das Screening wurde die Vorkultur mit frischem Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Zunächst wurden 50 bzw. 25 µl steriles LB-Medium in die 96- bzw. 384-Well-MTPn verteilt, es folgte die Zugabe der Substanzen mittels Pipettierroboter. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe der Bakteriensuspension (50 bzw. 25 µl). Das Endvolumen lag in 96-Well-MTPn bei 100 µl und in 384-Well-MTPn bei 50 µl pro Well. Das Startinokulum entsprach damit der OD₆₀₀ = 0,1. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der OD₆₀₀ oder die Messung der Fluoreszenz-Emission bei 535 nm nach Anregung bei 485 nm.

Bestimmung der MHK und MBK mit *V. cholerae*

Das Protokoll der im Folgenden beschriebenen MBK-Bestimmung entspricht der Deutschen Norm DIN 58940-7 (92). Für die Bestimmung der MBK (Minimale bakterizide Konzentration) und MHK (Minimale Hemm-Konzentration) wurden alle untersuchten Bakterienstämme (bis auf *Acinetobacter baumannii* mit einem spezifischen Medium, siehe Tabelle 5) in 5 ml MH-Medium bei 37 °C und 180 rpm ü. N. angezogen. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur so angeimpft, dass die Zelldichte des Inokulums im Bereich von 2×10^5 KBE/ml bis 8×10^5 KBE/ml lag. Die Bestimmung der MBK- und MHK-Werte erfolgte in 96-Well-MTPn. Die Wells von Spalte 1 wurden jeweils mit 200 µl der Hauptkultur befüllt, die Wells der Spalten 2-11 enthielten jeweils 100 µl der Kultur. In Doppelbestimmung wurden in Spalte 1 die zu untersuchenden Substanzen gegeben. Es erfolgte spaltenweise eine serielle Verdünnung mit 100 µl (Verdünnung 1:2) von links nach rechts auf der MTP. Aus Spalte 11 wurden zuletzt 100 µl entfernt, so dass hier ebenfalls ein Volumen von 100 µl verblieb. Ziel war das gleiche Volumen von 100 µl in allen Wells. In den Wells der Spalte 12 befand sich steriles Medium als Referenz für die anschließende Messung. Für die Bestimmung der MHK-Werte wurden die Platten 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Für die MBK-Bestimmung wurden aus den Wells 2 h, 6 h und 24 h nach Zugabe der Substanzen, jeweils 10 µl entnommen und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diejenige Konzentration, bei der die initiale KBE nach 6 h um 99,9 % reduziert wurde, entsprach der MBK.

Generierung von resistenten *V. cholerae* Mutanten

Das Protokoll zur Resistenzentwicklung erhielten wir von der AG Chronische Pseudomonas Infektionen des HZI (Leitung Prof. Dr. Susanne Häußler).

Für die Erzeugung resistenter Mutanten wurden LB-Agarplatten mit jeweils der 5fachen, 10fachen und 20fachen MHK der Wachstum inhibierenden Substanz vz0500, vz0825 oder 1541-0004 gegossen. Dabei erfolgte die Zugabe der Substanzen bei einer Maximaltemperatur des LB-Agars von 40 °C um Zersetzen zu vermeiden.

Parallel dazu wurden die Kulturen des *V. cholerae* Stamms NM06-058 vorbereitet. 10 ml LB-Medium wurden mit einigen Kolonien angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde 10 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und die OD₆₀₀ bestimmt. Anschließend wurden die Proben auf eine OD₆₀₀ = 10 oder 1×10^{10} KBE/ml eingestellt. Jeweils 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf die wirkstoffhaltigen LB-Agarplatten gegeben und verteilt. Die Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden erneut auf Wirkstoff haltige Platten ausgestrichen. Für die auf zweiter Platte gewachsenen Kolonien wurde erneut die MHK bestimmt (siehe Seite 31).

Poolen der resistenten Mutanten und Isolierung der genomischen DNA aus *V. cholerae*

Die 15 resistenten Mutanten und der Wt Stamm NM06-058 wurden individuell in jeweils 5 ml LB-Medium nach Animpfung für 6 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt und die 15 Kulturen der Mutanten wurden in übereinstimmender Menge gepoolt. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte aus zwei Proben: 1. dem Wt Stamm und 2. dem Pool der 15 resistenten Mutanten. Die Bakteriensuspensionen wurden für 10 min bei 7.500 rpm abzentrifugiert, so dass jeweils 2×10^9 Zellen im Pellet vorlagen.

Die Isolierung der DNA wurde nach folgendem Protokoll des „DNeasy Blood and Tissue“ Kits durchgeführt. Für die Lyse wurde das Pellet mit 2×10^9 Zellen in 180 µl ATL Puffer resuspendiert, 20 µl Proteinase K wurden zugegeben, gevortext und für 1 h bei 56 °C unter Schütteln bei 300 rpm in einem Heizblock inkubiert. 10 µl RNase A (SL 10 mg/ml) wurden zugegeben und 6 min bei RT inkubiert. Bei der Fällung der DNA wurden die Probe 15 sec gevortext und 200 µl AL Puffer zugegeben, sofort folgte das Vortexen der Probe, die Zugabe von 200 µl EtOH (100 %ig) und erneutes Vortexen. Das Lysat wurde in die DNeasy Mini Zentrifugensäulchen überführt und für 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Dabei wurde die genomische DNA an die Membran der Säule gebunden und vom Durchlauf abgetrennt. Bei den Waschschritten wurde das Zentrifugensäulchen in ein neues Auffangröhrchen überführt, 500 µl AW1 Puffer wurden zugegeben und 1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Säulchen wurde erneut in ein neues Auffangröhrchen überführt, 500 µl AW2 Puffer wurde zugegeben und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Bei der Elution wurde das Säulchen in ein steriles 1,5 ml Eppi überführt, 100 µl AE Puffer wurde zugegeben, 1 min bei RT inkubiert und

1 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurden dieselben 100 ml AE Puffer erneut auf das Säulchen gegeben und zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte am NanoDrop ND-1000.

Genomsequenzierung

Die Genomsequenzierung und Auswertung der Daten wurde in der AG Genomsequenzierung des HZI (Leitung Dr. Robert Geffers) durchgeführt. Für die Fragmentierung der genomischen DNA und die Herstellung der Bibliotheken wurde nach dem Protokoll „Preparing Samples for Sequencing Genomic DNA“ von Illumina vorgegangen. Sequenziert wurden die hergestellten genomischen Bibliotheken mit der Illumina Cluster Station und dem Genome Analyzer IIx.

Die Sequenzdaten des Genome Analyzer IIx wurden in ein FastQ-Format transformiert. Mit Hilfe der CLC Genomics Workbench V. 4.7.2 Software erfolgte das Mapping des Wt Genoms von NM06-058 und des Genompools gegen den annotierten Stamm N16961. Durch die Anwendung der Software und Einstellung diverser Parameter, wie Sequenzierhäufigkeit der Bereiche, Länge der mutierten Bereiche, und Mutationshäufigkeit wurden Listen von SNPs und DIPs erstellt, die im Wt Genom und Genompool auftreten. Die Listen wurden untereinander verglichen.

2.2.4. Cholera toxin-Assays (CT-Assays): Screening und Evaluierung der Hits

CT-Screening: Zugabe der Substanzen

Der *V. cholerae* Reporterstamm MO10 pAKSB wurde in einer ü. N. Vorkultur im AKI-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin bei 37 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem Protokoll des Wachstumsassay auf Seite 31. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der OD₆₀₀. Screeningplatten der Substanzsammlungen die Hits enthielten, wurden erneut eingesetzt. Dieses Mal wurde MO10 pAKSB im AKI-Medium ohne Kanamycin inkubiert. Nur diejenigen Substanzen, die das bakterielle Wachstum von MO10 pAKSB im AKI-Kan-Medium, jedoch nicht im AKI-Medium reduzierten, wurden im CT-Screening als aktive Hits gewertet.

Bestimmung der IC₅₀-Werte mit MO10 pAKSB

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte der aktiven Substanzen wurde zunächst mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte in 96-Well-MTP. Jeweils 5 ml AKI-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin und Medium ohne Kanamycin wurden mit einigen Kolonien des Reporterstamms angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit den Vorkulturen und frischem Medium wurden die Hauptkulturen

mit einem Startinokulum von $OD_{600} = 0,1$ angelegt. Die Hauptkulturen wurden zu je 100 μ l pro Well (Spalte 1 je 200 μ l pro Well) in der Platte verteilt. Die Reihen A-D enthielten die Bakterienkultur mit dem Selektionsmedium AKI-Kan-Medium, die Reihen E-H enthielten die Kultur mit dem AKI-Medium ohne Antibiotikum. Auf einer Platte wurde jeweils eine Substanz in Doppelbestimmung analysiert. In die erste Spalte der Reihen A, B, E und F wurde die zu untersuchende Substanz gegeben. Die Spalten C, D, G und H enthielten 1 % DMSO zur Kontrolle. Es erfolgte spaltenweise eine serielle Verdünnung mit 100 μ l (Verdünnung 1:2) von links nach rechts der MTP. Aus Spalte 11 wurden zuletzt 100 μ l entfernt, so dass hier ebenfalls ein Volumen von 100 μ l verblieb. Die Wells der Spalte 12 enthielten steriles Medium als Referenz. Die Platten wurden 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend die OD_{600} gemessen. Die CT reduzierenden Substanzen bewirkten eine Reduktion des bakteriellen Wachstums im AKI-Kan-Medium. Die gleiche Kultur ohne Wirkstoff zeigte keine Reduktion im Wachstumsverhalten. Im AKI-Medium ohne Kanamycin erfolgte ebenfalls keine Reduktion des Wachstums. Der IC_{50} -Wert entsprach der Substanzkonzentration, die das Wachstum des Reporterstamms im AKI-Kan-Medium um 50 % reduzierte.

Etablierung des G_{M1} -ELISA

Das Protokoll des G_{M1} -ELISAs wurde vom indischen Projektpartner zur Verfügung gestellt. Einige Modifizierungen und Anpassungen des Protokolls wurden vorgenommen. Der G_{M1} -ELISA wurde mit den *V. cholerae* Wt Stämmen N16961 und NM06-058 durchgeführt.

Kulturvorbereitung: 5 ml AKI-Medium wurden mit einigen Kolonien angeimpft und etwa 6 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde die AKI-Hauptkultur mit einem Startinokulum von $OD_{600} = 0,1$ angelegt. Die Hauptkultur wurde zu je 2 ml in 13 ml Kulturröhrchen mit aerobem Verschluss verteilt. Zu den 2 ml Kulturen wurden die zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen gegeben. Als Kontrolle wurde in ein weiteres Röhrchen das gleiche Volumen DMSO gegeben. Die Kulturröhrchen wurden für 16 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Vor der Durchführung des ELISAs wurde die OD_{600} der einzelnen Kulturen gemessen, um sie bei der Auswertung zu berücksichtigen. Die Kulturen wurden für 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:100, 1:10 und unverdünnt im G_{M1} -ELISA eingesetzt. Als Verdünnungspuffer wurde PBS mit 2 % (w/v) BSA verwendet.

G_{M1} -ELISA: Verwendet wurden MaxiSorp 96-Well-MTPn. Die Platten wurden mit 100 μ l 1,5 μ M G_{M1} in 150 mM Tris-HCl, pH 7,5, pro Well bei 4 °C über Nacht beschichtet. Es folgte dreimaliges Waschen der Platte mit PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20. Bei allen Waschschritten erfolgte das Verteilen des Waschpuffers mit einer Multi-Dispenser

Pipette und das Entfernen durch Ausklopfen der Platte. Zum Blocken der Platte wurden die Wells mit 150 µl PBS mit 2 % (w/v) BSA befüllt und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS 0,05 % Tween 20. Die verschiedenen Verdünnungsstufen der Kulturüberstände wurden in Doppelbestimmung zu je 100 µl in der Platte verteilt. Parallel dazu wurde eine CT-Standardkurve erstellt. Dazu wurde CT mit einer Anfangskonzentration von 16 ng/ml seriell verdünnt (Verdünnung 1:2) und ebenfalls in Doppelbestimmung in der Platte verteilt. Nach Zugabe der Proben wurde die Platte 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Um die Menge des gebundenen CTs zu detektieren, wurde die Platte durch Ausschlagen entleert und erneut mit PBS 0,05 % Tween 20 gewaschen. Für den immunologischen Nachweis der CT-Moleküle wurde als primärer Antikörper (AK) der Anti-Choleratoxin-AK aus Kaninchen mit einer Verdünnung von 1:2.000 in PBS mit 2 % (w/v) BSA gewählt. Jeweils 100 µl pro Well wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Ausschlagen des primären AKs, drei Waschschrte mit PBS 0,05 % Tween 20 und die Zugabe des sekundären AKs. Hierbei handelte es sich um ein HRP konjugieren Anti-Kaninchen-AK aus Ziege in einer Verdünnung von 1:2.500. Dieser AK wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend durch Ausklopfen der Platte entfernt und diese mit PBS 0,05 % Tween 20 gewaschen.

Für die Detektion wurde Citrat-Puffer mit 1 mg/ml o-Phenylendiamin Hydrochlorid (OPD) eingesetzt, in den unmittelbar vor Verwendung Wasserstoffperoxid mit einer Finalkonzentration von 0,02 % gegeben wurde. Jeweils 100 µl des Citrat-Puffers mit dem OPD Substrat wurden pro Well zugegeben, die Platte wurde 5 min im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit 100 µl 4 N Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der Platte erfolgte am MTPn-Lesegerät, dabei wurde die OD₄₈₅ detektiert. Anhand der CT-Standardkurve und unter Einbeziehen der Verdünnungsstufen sowie der zuvor gemessenen OD₆₀₀ der Bakterienkulturen, wurde die produzierte Menge des CTs in ng/ml errechnet, bezogen auf eine Kultur mit der OD₆₀₀ = 1. Erfasst wurde bei dem Verfahren das im Überstand einer Kultur vorhandene, also von den Bakterien sekretierte CT.

Detektion des Choleratoxins mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Kulturvorbereitung geschah auf gleiche Weise wie für den G_{M1}-ELISA (beschrieben aus Seite 34). Bei allen 2 ml Kulturen wurde nach der 16-stündigen Inkubation die OD₆₀₀ gemessen und auf 3,0 eingestellt, so dass überall die gleiche Zelldichte vorlag. Jeweils 1 ml wurde 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 200 µl Wasser resuspendiert, mit dem 4fach Roti®-Load 1 Ladepuffer versehen, 10 min bei 95 °C denaturiert und für die SDS-PAGE verwendet.

Jeweils 15 µl der vorbereiteten Proben wurden in die Taschen eines 10 %igen SDS-Gels gefüllt. Das Gel wurde zunächst 30 min bei 60 Volt gehalten, so dass die Proben gleichmäßig durch den oberen Teil des Gels (Sammelgel) laufen konnten. Anschließend erfolgte die Trennung für eine Stunde bei 160 Volt. Auf jedem Gel wurden 5 µl des Proteinmarkers „Precision Plus Protein™ Dual Color Standards“ eingesetzt, um die Größe der Probenbanden bestimmen zu können. Anschließend wurde entweder eine Coomassie-Färbung der Proteine im Gel durchgeführt (ü. N. mit Coomassie-Lösung färben, dann für 2 x 1 h Entfärben mit der Entfärbelösung, Aufbewahren in H₂O) oder das Gel für einen Western Blot eingesetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
	Gesamtvolumen: 10 ml	Gesamtvolumen: 5 ml
H ₂ O	4,05 ml	3 ml
1 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
30 % Acrylamid	3,3 ml	650 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot) und Detektion der transferierten Proteine

Nach der SDS-PAGE wurden das zu transferierende Gel sowie einige Filterpapier-Stücke und die Nitrocellulose-Membran kurz in Blot-Transferpuffer equilibriert. Auf die Kathode der Semidry Blotkammer wurden sechs feuchte Filterpapiere aufgelegt und darauf luftblasenfrei die Nitrocellulose-Membran, das Acrylamidgel und sechs weitere Filterpapiere geschichtet. Nach dem Aufbringen der Anode wurde eine Stromstärke von 8 mA/cm² Gelfläche für 1,25 h angelegt.

Nach Transfer der Proteine von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese 3 x mit TBST und nachfolgend 1 x mit TBS für jeweils fünf Minuten bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Membran wurde ü. N. bei 4 °C in einer Lösung des Primärantikörpers (1:2.000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch in TBST) geschüttelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils fünf Minuten wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:4.000 verdünnt in 5 % (w/v) Magermilch in TBST) für 2 h bei RT inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese dann für fünf Minuten mit 2 ml des SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrats inkubiert. Die Nitrocellulose-Membran wurde abschließend unter Lichtabschluss mit einem Röntgenfilm zusammengefügt und dieser nach variabler Zeit entwickelt.

Eine Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte nach dem Einscannen der entwickelten Röntgenfilme und einer Pixel-Intensitätsbestimmung mit der Software ImageJ.

Isolierung und Qualitätsbestimmung der RNA aus *V. cholerae* Stamm NM06-058

Für die Isolierung der RNA aus *V. cholerae* wurde das „RNeasy Mini Kit for Isolation of total RNA from Bacteria“ verwendet. Nach folgendem Protokoll wurde verfahren. Die Kulturvorbereitung erfolgte auf gleiche Weise wie für den G_{M1}-ELISA (siehe Seite 34) und SDS-PAGE. Die Kulturen wurden jedoch nur 12 h bei 37 °C inkubiert.

Das 2fache Volumen des „RNAprotect Bacteria Reagents“ wurde auf ein Kulturvolumen mit 5×10^8 Zellen gegeben, sofort für 5 sec gevortext, 5 min bei RT inkubiert und 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Eppis offen auf einem Tuch ausgeklopft, um möglichst ein trockenes Pellet zu erhalten. Das Pellet wurden in 350 µl RLT Puffer (10 µl β-Mercaptoethanol / 1 ml RLT Puffer) mit 25-50 mg Glasbeads (150-160 µm Durchmesser) resuspendiert und 3 min gevortext. Um unlösliche Zellbestandteile und die Glasbeads zu entfernen, wurde 10 sec bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppis überführt. Gleiches Volumen Ethanol (70 %) wurden zugegeben und mittels invertieren der Eppis gemischt. Die etwa 500-700 µl wurden anschließend in ein RNeasy Zentrifugensäulchen überführt und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Gewaschen wurde das Säulchen mit 700 µl RW1 Puffer. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Die Elution der RNA erfolgte mit 87,5 µl RNase freiem Wasser. Diese RNA wurde einem DNaseI Verdau unterzogen. 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl DNaseI aus dem „RNase-Free DNase Set“ wurden zur RNA gegeben und 20 min bei 25 °C inkubiert. Für die RNA Reinigung nach dem Verdau wurden zu den vorliegenden 100 µl 350 µl RLT Puffer zugegeben und gut gemischt. Es folgte die Zugabe von 250 µl Ethanol (100 %) und eine Vermischung durch Invertieren der Eppis. Die vorliegenden 700 µl wurden in ein neues Zentrifugensäulchen überführt und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Zuletzt wurden die Säulchen 2 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert und die RNA mit 35 µl RNase freiem Wasser eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde am NanoDrop ND-1000 durchgeführt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption

bei 260 und 280 nm, mit Wasser als Referenz. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl gleichgesetzt. Der Quotient als Maß für die Reinheit der RNA sollte nach einer 260/280 nm Messung bei mindestens 1,8 liegen, ein Quotient von 2,0 entspricht reiner RNA.

Qualitätskontrolle der RNA: Von den Mitarbeitern der Array Facility des HZI wurde die aufgereinigte RNA mittels des Agilent-2100-Bioanalyzers elektrophoretisch aufgetrennt. Bei qualitativ geeigneter RNA werden auf dem Gel drei distinkte Banden sichtbar, die der ribosomalen RNA (der 23S, 16S und 5S rRNA) entsprechen. Degradierete RNA würde in Form von indistinkten Banden erkennbar sein, die als „Schmier“ über den gesamten Auftrennungsbereich auftreten würden. Basierend auf dieser Auftrennung wurden mit Hilfe der dem Bioanalyzer beigelegten Software Elektropherogramme erstellt und jeweils ein RIN-Wert (*RNA integrity number*) errechnet, anhand dessen die Qualität der RNA beurteilt wurde.

Durchführung der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die Herstellung der cDNA wurde das „ProtoScript™ M-MuLV First Strand cDNA Synthese Kit“ verwendet. Nach folgendem Protokoll wurde verfahren. Bei der Denaturierung wurde ein Gesamtvolumen von 8 µl mit 1,5 µg RNA, Wasser und 2 µl Random Primer Mix gemischt, 5 min bei 70 °C erwärmt, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Zu der denaturierten RNA wurden 10 µl M-MuLV Reaction Mix und 2 µl M-MuLV Enzym Mix gegeben, gemischt und abzentrifugiert. Der Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 20 µl wurde dem folgenden PCR-Programm unterzogen.

Tabelle 15: RT-PCR Programm

Ausführender Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung der Primer	5 min	70 °C
Zugabe Reaktion- und Enzym-Mix		
Anlagerung der Primer	5 min	25 °C
Elongation	1 h	42 °C
Denaturierung der Enzyme	5 min	80 °C

Bevor die cDNA in die Real Time-PCR eingesetzt wurde, wurden auf 1 µg eingesetzter RNA, 8 µl TE Puffer zugegeben.

Durchführung der quantitativen Real Time-PCR (qRT-PCR)

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde mit dem Gerät LightCycler® 480 und dem dazugehörigen „LightCycler® 480 SYBR GreenI Master“ Kit gearbeitet. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software. Das Pipettier- und PCR-

Protokoll stammte aus der AG Genomanalytik des HZI (Leitung Dr. Robert Geffers) und wurde übernommen.

In der vorliegenden cDNA wurden mittels der qRT-PCR das Gen *aphA*, die Virulenzgene *ctxA*, *tcpA* und als Kontrolle das Housekeeping Gen *recA* amplifiziert. Für alle Gene wurden Primerpaare mit den entsprechenden Sequenzen verwendet (siehe Tabelle 11). Die Primer hatten eine Länge von 19-21 nt, die bei der qRT-PCR resultierenden Amplifikate hatten eine Länge von 65 nt für *aphA*, 66 nt für *recA*, 74 nt für *ctxA* und 66 nt für *tcpA*.

Ein qRT-PCR Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und enthielt je 500 nmol/l des 5'-Primers und 3'-Primers, 1 µl der cDNA aus dem RT-PCR Ansatz und 10 µl des SYBR GreenI Master Mix, wobei die Durchführung in einer 96-Well-PCR-Platte erfolgte. Parallel zu der Amplifizierung der gesuchten Gene *aphA*, *ctxA*, *tcpA* und *recA* wurde für eine Kontrolle der Richtigkeit der qRT-PCR aus allen cDNA Proben eine Standardreihe in 5 verschiedenen Verdünnungen angefertigt.

Tabelle 16: qRT-PCR Protokoll

Ausführender Schritt		Zeit	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen	
Amplifikation	initiale Denaturierung	5 min	95 °C	}	45 x
	Denaturierung	10 sec	95 °C		
	Anlagerung der Primer	10 sec	60 °C		
	Elongation	10 sec	72 °C		
Schmelzkurve	Denaturierung	5 sec	95 °C	}	1 x
	Anlagerung der Primer	1 min	65 °C		
	Kühlung	30 sec	40 °C		

Transkriptomanalysen

Die Versuche der Transkriptomanalyse wurden am NICED von den Projektpartnern durchgeführt.

2.2.5. PPO-Assay: Entwicklung, Etablierung und Screening

Amplifizierung der *hemG*-Sequenz aus *V. cholerae* mittels Kolonie-PCR

Die *hemG*-Nukleotidsequenz aus dem *V. cholerae* El Tor Stamm N16961, mit dessen Hilfe die Primer gewählt wurden, stammt von NCBI (siehe Anhang 6.3). Für die Amplifizierung der *hemG*-Sequenz wurde in diesem Versuch der *V. cholerae* El Tor Stamm CM-2 verwendet.

Kolonie-PCR: Eine Kolonie von CM-2 wurde gepickt und in 50 µl steriles H₂O gegeben. Das Wasser mit den bakteriellen Zellen wurde 10 min bei 95 °C aufgeköcht. 180 µM dNTP-Mix, jeweils 0,7 µM des 5'-Primers und des 3'-Primers (siehe Tabelle 11), 3 µl der REDTaq® Genomic DNA Polymerase mit MgCl₂ und 10 x PCR-Puffer wurden zu den 50 µl Bakteriensuspension gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 70 µl entstand. Anschließend wurde mit dem Ansatz eine Kolonie-PCR durchgeführt.

Tabelle 17: Kolonie-PCR Protokoll

Ausführender Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Wiederholungen
initiale Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 x
Denaturierung	30 sec	94 °C	
Anlagerung der Primer	30 sec	65,7 °C	
Elongation	2 min	72 °C	
finale Elongation	5 min	72 °C	
Kühlung	∞	4 °C	

Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Wenige µl der Ansätze wurden nach Beendigung der PCR mit Ladepuffer versetzt, auf ein 1 %iges Agarosegel aus dem TAE Puffer aufgetragen und 40 min bei 120 V aufgetrennt.

Aufreinigung, Verdau und Ligation

Die durch PCR synthetisierte DNA wurde mit dem „PCR-Purification Kit“ aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR-Produkte sowie der Vektor pET33b(+) mit den Restriktionsenzymen NdeI/HindIII sowie NcoI/SalI für 4 h bei 37 °C verdaut. Nach Überprüfung des Verdaus auf Erfolg mittels elektrophoretischer Auftrennung wurden die Verdaue des *hemG*-Inserts mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Der geschnittene Vektor wurde mittels Agarosegel aufgetrennt, herausgeschnitten und mit dem „QIAquick® Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Die *hemG* kodierende DNA wurde anschließend mit dem linearisierten Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase ü. N bei 4 °C. Pro Ligationsreaktion wurden 500 ng Vektor-DNA und die 2fache Menge an Insert eingesetzt.

Nach erfolgreicher Klonierung in den Vektor pET33b(+), folgte die Expression der rekombinanten Proteine unter der Kontrolle des T7-Promoters. Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass das rekombinante Protein in einem Konstrukt den His-Tag N-terminal und im zweiten Konstrukt C-terminal trug.

Transformation

Die Ligationsansätze wurden mittels Hitzeschock in chemokompetente Zellen des Stammes *E. coli* DH5 α eingebracht und auf LB-Medium mit Kanamycin selektiert. Dazu wurde das Vektor-Insert-Konstrukt zunächst mit den *E. coli*-Zellen vermischt und 15 min auf Eis stehen lassen, anschließend wurde die Mischung exakt 90 sec bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe des LB-Mediums wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Antibiotikazusatz ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Plasmidpräparation, Kontrolle der Ligation und Transformation in BL21(DE3)

Auf den LB-Agarplatten gewachsene Klone wurden gepickt und eine Kolonie-PCR (siehe Seite 39 und Tabelle 17) mit dem T7-Promotor Primer und dem T7-Terminator Primer durchgeführt. Hiermit wurde überprüft ob das Fragment mit der gesuchten Größe amplifiziert werden konnte. Die Klone mit dem gewünschten PCR-Amplifikat wurden ausgewählt und im LB-Medium mit Kanamycin vervielfältigt. Aus einer ü. N. Kultur erfolgte eine Plasmid-Präparation mit Hilfe des „QIAGEN® Plasmid Extraction Kits“. Mittels einer Sequenzanalyse in der AG Genomanalyse (HZI) konnte gezeigt werden, dass die im Vektor pET33b(+) vorliegende *hemG* Sequenz fehlerfrei war. Die isolierten Plasmide wurden nun in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Nach der Transformation wurden einige der, auf LB-Agarplatten mit Kanamycin wachsenden Klone gepickt und wie oben beschrieben eine zweite Kolonie-PCR durchgeführt.

Proteinexpression

Jeweils ein Klon mit dem gewünschten pET33b(+):*hemG* Konstrukt wurde ausgewählt und ü. N. in LB-Medium mit Kanamycin kultiviert. 500 ml LB-Medium mit Kanamycin wurden 1:100 mit dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über mehrere Stunden inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde regelmäßig überprüft. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 500 μ M IPTG (Endkonzentration) induziert. 3 bis 4 h nach Induktion der Expression wurde die Kultur mittels Zentrifugation bei 4 °C geerntet. Die Zellpellets wurden bis zum Zellaufschluss und der Protein-Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

Zellaufschluss und Aufreinigung

Die bei -20 °C gelagerten Pellets wurden nach Auftauen in 30 ml 4 °C kaltem Lysepuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase I sowie 5 mM MgSO₄ (Endkonz.) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreifache Behandlung der Zellsuspension im Hochdruckhomogenisator (Abteilung Molekulare Strukturbiologie, HZI). Das Zelllysate wurde 30 min bei 4 °C und 20.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgenommen. Auf eine Säulenmembran wurden 2 ml Ni-NTA-

Agarose gegeben und nach dem Durchlauf der Flüssigkeit wurde die Säule mit einigen ml Waschpuffer I equilibriert. Anschließend wurde der Überstand auf die Säule gegeben und diese mit je ca. 6 ml der Waschpuffer I-IV mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (10-100 mM) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 250 und 500 mM Imidazol haltigem Puffer.

Von den einzelnen Durchläufen bei der Waschprozedur sowie vom Lysat, vom Pellet und vom Eluat wurden Proben entnommen und auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt.

BCA-Test

Die Konzentration des aufgereinigten Proteins im Eluat wurde mit dem BCA-Test ermittelt. Dazu wurde eine Kalibriergerade mit BSA erstellt, welches in Elutionspuffer verdünnt wurde und der Test laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bestimmung der N-terminalen HemG AS-Sequenz

Für die Sequenzierung der in *E. coli* exprimierten und gereinigten PPO aus *V. cholerae* wurden 500 µl (30 ng/ml) des aufgereinigten HemG-Proteinkonstrukts mit einem N-terminalen His-Tag, an die Abteilung Strukturbioogie des HZI gegeben. Zur Bestimmung der AS-Abfolge wurde der Edman-Abbau angewandt.

SDS-PAGE und Western Blot

Die während der Lyse und Aufreinigung entnommenen Proben wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen, um zu kontrollieren ob die Expression, die Lyse und Aufreinigung von HemG erfolgreich war.

Für die Detektion des HemG auf der Nitrocellulose-Membran des Western Blots, wie auf Seite 36 beschrieben, wurde der primäre Anti-His-Tag-AK aus der Maus (Verdünnung 1:1.000) und der sekundäre HRP konjugierte Anti-Maus-AK aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:2.000) eingesetzt.

Reduktion von Protoporphyrin IX zu Protoporphyrinogen IX

Das Protokoll zur Herstellung von Proto´gen wurde aus den Publikationen (93) und (94) übernommen. Vor Beginn des Experiments wurden alle benötigten Lösungsmittel und Gefäße mit Argon ausgeblasen, um den Sauerstoff zu verdrängen. In 18 ml MeOH wurden 1,12 mg Proto (100 µM) gelöst und weitere 2 ml NH₄OH (Endkonzentration 10 mM) zugegeben. Als Katalysator wurden 10 mg Palladium auf Aktivkohle zugegeben. Die Suspension wurde für 3,5 h mit Wasserstoff begast. Vor, während und nach der 3,5-stündigen Reduktion wurde der Verlauf durch HPLC verfolgt. Nach der

Reduktion wurde das Produkt filtriert, um die Aktivkohle zu entfernen und das Filtrat wurde bei -70 °C gelagert. Vor jedem Experiment wurde die jeweils benötigte Menge dieser Stammlösung in der Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand im Proto´gen Puffer aufgenommen.

Screening: Zugabe der Substanzen

Zunächst wurden 50 µl des PPO-Assay Puffers mit dem Enzym PPO (Endkonz. in 75 µl ist 2 µg/ml) in jedes Well einer 96-Well-MTP verteilt. Hierauf wurden die Substanzen mittels Pipettierroboter zugegeben. Im letzten Schritt erfolgte mit einer Mehrkanalpipette die manuelle Zugabe von 25 µl des Substrats Proto´gen, das ebenso im PPO-Assay Puffer vorlag (Endkonz. in 75 µl ist 150 µM). Unmittelbar nach Zugabe des Substrats wurde die erste Messung der Fluoreszenz-Emission bei 620 nm nach Anregung bei 330 nm durchgeführt. Im Abstand von 10 min folgten weitere Messungen, wobei die letzte Messung 60 min nach Zugabe des Substrats erfolgte.

2.2.6. Adhäsionsassay: Entwicklung und Etablierung

Antikörperherstellung gegen *V. cholerae*

Für die Herstellung des *V. cholerae* spezifischen Antikörpers wurde die Bakterienkultur für die Immunisierung einer Maus vorbereitet.

5 ml des LB-Mediums wurden mit einigen Kolonien des CM-2 Stammes inokuliert und etwa 6 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur von 12 ml LB-Medium ($OD_{600} = 0,1$) angeimpft und weitere 24 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die bewachsene Kultur wurde 15 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert, so dass sich die $OD_{600} = 1$ einstellte. Zu dieser Bakteriensuspension wurde Glutaraldehyd mit einer Endkonzentration von 2 % (v/v) gegeben. Diese Suspension wurde 18 h bei 4 °C auf einem Wippschüttler inkubiert. Zur Kontrolle der verbleibenden Vitalität nach Inaktivierung, wurde 1 ml abzentrifugiert, auf eine LB-Agarplatte ausplattiert und ü. N. inkubiert. Auf der Platte wuchsen keine Kolonien, demnach war die Präparation erfolgreich. Die restlichen 11 ml wurden erneut abzentrifugiert und das Glutaraldehyd wurde durch mehrere Waschschrte mit PBS entfernt. Anschließend wurde das Pellet in PBS mit einer $OD_{600} = 1$ aufgenommen. 2 ml dieser Suspension mit toten *V. cholerae* Zellen wurde an Dr. Christian Erck (HZI) weitergegeben, der die Immunisierung der Mäuse vornahm.

Protokoll des Adhäsionsassays

Abbildung 9 zeigt schematisch das Protokoll des Adhäsionsassays.

Material und Methoden

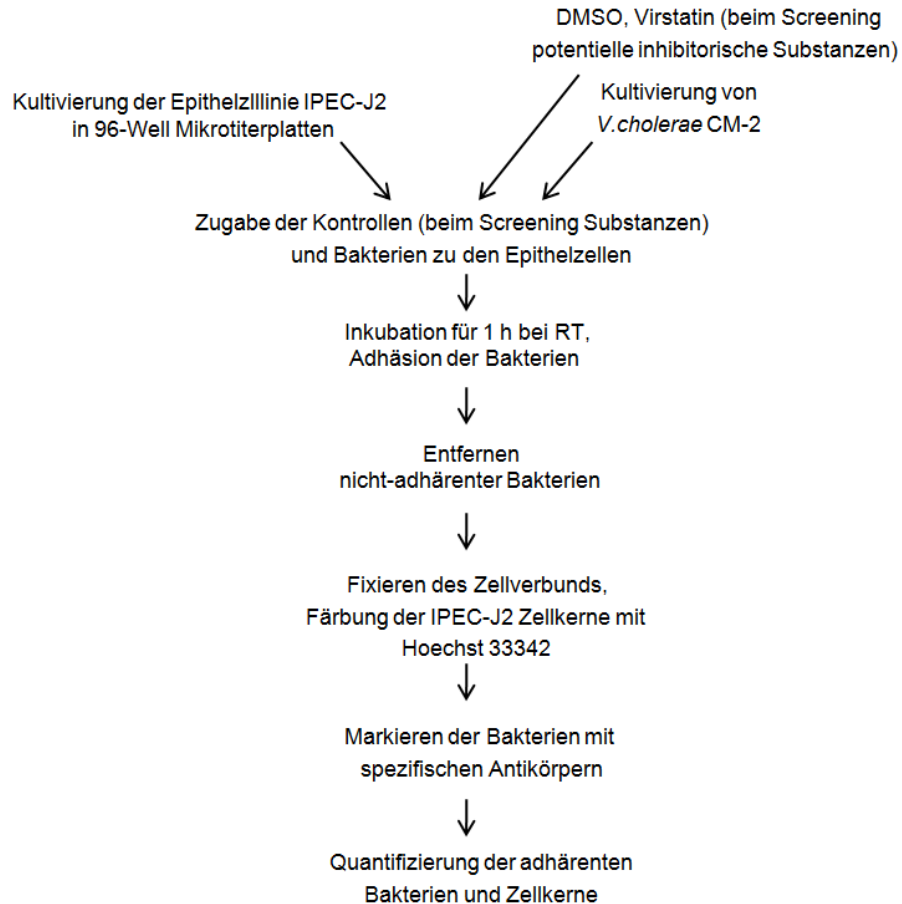


Abbildung 9: Übersicht des Versuchsschemas des Adhäsionsassay.

IPEC-J2: Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ml zu je 100 µl in die Wells einer 96-Well-MTP eingesät und 5 d inkubiert, bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Zur Durchführung des Experiments wurde das verbrauchte Medium durch 50 µl neuen Mediums ersetzt.

DMSO-Zugabe: Für die Etablierung des Assays wurde zu den 50 µl Medium, jeweils 1 µl DMSO mit dem Pipettierroboter Evolution P3 von PerkinElmer gegeben. Der Transfer erfolgte mit dem 96er Pipettieraufsatz des Roboters.

V. cholerae: Der Stamm CM-2 wurde am Vortag angesetzt und in einer ü. N. Kultur für 16 h in LB-Medium inkubiert. Am Folgetag wurde die Kultur zentrifugiert, mit PBS gewaschen, im Zellkulturmedium resuspendiert und eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt.

Zugabe von V. cholerae: Direkt im Anschluss an die DMSO-Zugabe zu IPEC-J2 wurden jeweils 50 µl Bakteriensuspension (mit einer OD₆₀₀ von 0,2) pro Well zugefügt (OD₆₀₀ im Assay 0,1).

Adhäsion: Die Adhäsion erfolgte für 1 h bei RT.

Entfernen nicht-adhärenter Bakterien: Nach der 1-stündigen Adhäsion wurden die nicht-adhärenenten Bakterien mittels der Absaugpumpe mit 8-Kanal-Kamm entfernt. Es wurde zweimal mit 150 µl PBS pro Well gewaschen. Dazu wurde das PBS mit einer Multi-Dispenser Pipette verteilt.

Fixieren / Färben der Zellkerne: Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 100 µl 4 %iger Paraformaldehydlösung in PBS für 30 min bei 37 °C. Gleichzeitig wurde zum Fixiermedium der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 mit einer Endkonz. von 5 ng/ml gegeben. Während der folgenden 30 min wurden sowohl die Zellen und die adhärenenten Bakterien fixiert, wie auch die Zellkerne markiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen.

Markieren der Bakterien: Für die Markierung der Bakterien wurde zuerst mit dem Serum aus der Maus gegen den Stamm CM-2 (Verdünnung 1:500 in PBST 5 %BSA) für 1 h bei RT inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Ziege-Anti-Maus-Alexa488 AK (Verdünnung 1:2000 in PBST 5 %BSA) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Vor der Quantifizierung wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen.

Messung und Quantifizierung: Die Quantifizierung erfolgte sowohl mit dem MTPn-Lesegerät Fusion von Perkin Elmer (Messung der Fluoreszenz bei 485/535 nm), als auch durch Erstellung von Bildern mit dem IXM von Molecular Devices, welche anschließend mit Hilfe der Software MetaXpress analysiert wurden.

Akquise-Einstellungen

Die Software MetaXpress diente zur Steuerung des IXM. Die wichtigsten Einstellungen, die für die Aufnahme der Bilder vorgenommen wurden, sind im Folgenden aufgeführt. Genauere Beschreibungen und detaillierte Angaben sind im Handbuch des Herstellers zu finden [Molecular Devices, Acquisition Guide, 2006].

Vergrößerung: Für das HTS wurde das 20X-Objektiv verwendet.

Kamera-Binning (Zusammenfassung): Binning beschreibt die Reduktion zweier oder mehrerer Pixel zu einem. Beispielsweise werden bei einem Binning mit dem Wert 2x2 Pixel zu einem Pixel zusammengefasst. Je größer der Wert des Binning, desto niedriger die Auflösung, aber umso höher ist das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Binning reduziert außerdem die Belichtungszeiten, die Dauer der Aufnahme und die Größe der Datenmenge. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer mit einem Binning von 2 gearbeitet, da es einen guten Kompromiss zwischen anfallender Datenmenge und akzeptabler Auflösung darstellt.

Kamera-Gain (Verstärkung): Der hier eingestellte Wert stellt die Verstärkung der Kamera dar. Je höher der Wert, desto kürzer die Belichtungszeiten. Da sowohl die Objekte als auch der Hintergrund verstärkt werden, wird das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis durch Erhöhung des Werts nicht verbessert. Es wurde hier immer ein Gain von 1 eingestellt.

Platte: Für die Einstellungen der Platte werden alle Plattendimensionen wie Höhe, Länge, Breite, Anzahl und Durchmesser der Wells, usw. benötigt. Diese Angaben wurden vom Plattenhersteller übernommen. Für eine optimale Bilderstellung sind hier insbesondere die genaue Vermessung der optischen Dichte des Plattenbodens sowie der Höhenunterschied zwischen zwei benachbarten Wells essentiell. Diese können mittels des Lasers bestimmt werden. Die Werte müssen nur einmal für jedes Fabrikat erhoben werden und können anschließend übernommen werden.

Auswahl der Wells: Für die Akquise können die Positionen ausgewählt werden, in denen Bilder erstellt werden sollen. Beim Screenen waren meist alle Wells belegt, somit wurden Bilder in allen Wells aufgenommen.

Auswahl der Sites (Bildpositionen): Die Anzahl sowie die Lage der aufzunehmenden Bilder in jedem Well konnten manuell bestimmt werden. Für das HTS wurden neun Positionen aufgenommen, die mittig lagen, aus denen bei der Auswertung die Werte gemittelt wurden.

Anzahl der Wellenlängen: Für das HTS wurden zwei Filter Sets verwendet: DAPI mit der Emissionswellenlänge 447 nm bei Anregungswellenlänge 387 nm (für die gefärbten Zellkerne der Epithelzellen) und FITC mit der Emissionswellenlänge 536 nm bei Anregungswellenlänge 482 nm (zur Quantifizierung der Bakterien).

Autofokus-Option: Bei der Arbeit mit dem IXM kann zwischen laser- und bildbasiertem Autofokus gewählt werden. Beim bildbasierten Fokus werden in einem vorher bestimmten Bereich mehrere Bilder erstellt und das am besten fokussierte Bild, basierend auf speziellen Algorithmen, automatisch ausgewählt. Die Aufnahme der Bilder mit dieser Methode ist zeitintensiver als die Aufnahme mit laserbasiertem Autofokus, bei dem anhand von Laserreflektionen der Boden des Wells ermittelt wird. Da mittels der etablierten Methode viele Substanzen auf Aktivität getestet werden sollten, wurde stets der laserbasierte Fokus verwendet, da dies eine große Zeitersparnis im Gegensatz zum bildbasierten Autofokus darstellt, und die Aufnahmen zufriedenstellende Ergebnisse lieferten.

Autofokus-Einstellungen (laserbasiert): Hier kann gewählt werden, an welchen Stellen Laserreflektionen zur Bestimmung der Aufnahmeposition verwendet werden sollen

(Plattenboden, Wellboden oder beides). Dafür spielt z. B. die Dicke des Plattenbodens eine Rolle. Es wurde immer auf den Wellboden fokussiert. Des Weiteren kann bestimmt werden, ob für jedes Bild fokussiert werden soll oder nur ein Mal pro Well. Die Einstellungen für diese Arbeit waren stets der Autofokus aller Bilder.

Einstellungen für die Wellenlängen: Für jede Wellenlänge mussten sowohl die Belichtungszeit als auch die Z-Position für die Aufnahme (Entfernung vom Wellboden) festgelegt werden. Diese wurden manuell eingestellt und optimiert.

Bildanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund

Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit wichtigen Einstellungen und Parameter zur Bildanalyse beschrieben [Molecular Devices, Analysis Guide, 2006].

Verschiedene Applikationsmodule stehen für die Bildanalyse je nach Anwendungsziel zur Verfügung. Für diese Arbeit wurde ausschließlich das Modul „Transfluor“ verwendet. Transfluor wurde für die vorliegende Arbeit genutzt, um die Anzahl der Hoechst-gefärbten IPEC-J2-Zellkerne zu bestimmen und die adhärenenten Bakterien zu quantifizieren. Zur Quantifizierung der Bakterien wurde bei diesem Modul die Option gewählt, die ursprünglich zur Erfassung intrazellulärer Vesikel diente. Die für die Anwendung dieses Moduls nötigen Einstellungen sind für beide Wellenlängen gleich: Es wurde die ungefähre Größe der Objekte (minimale und maximale Breite) sowie die Intensität der Färbung der Objekte, die von der Software erfasst werden sollen, festgelegt. Die Einstellungen wurden für beide Wellenlängen manuell optimiert und hin und wieder überprüft. Diese Kontrolle konnte anschaulich direkt am Beispiel eines Bildes erfolgen: Die fluoreszierenden Partikel, die aufgrund der getroffenen Einstellungen von der Software erfasst wurden, wurden direkt im Bild markiert. Gegebenenfalls wurden dann die Einstellungen modifiziert und erneut angepasst. Abbildung 52 zeigt beispielhaft diese direkte Markierung im Bild.

Die Software ist in der Lage, zahlreiche verschiedene Deskriptoren bei der Analyse mit dem Modul Transfluor anzugeben. Ausschlaggebend für diesen Anwendungsbereich war die Ausgabe des Deskriptors „Vesicle count per cell“ (Bakterienzahl pro Zelle) und „Vesicle area per cell“ (Bakterienfläche pro Zelle).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Wachstumsassay

3.1.1. Entwicklung und Etablierung des Wachstumsassays

In den letzten Jahrzehnten tauchten immer mehr Bakterien mit Resistenzen gegen die bekannten Antibiotika auf, demzufolge steigen die durch multiresistente Bakterien ausgelösten Infektionen. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen aktiven Substanzen dringend notwendig, und es werden vielfach die Methoden des HTS eingesetzt. Aktive Substanzen sollen im Allgemeinen folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Eine hohe Aktivität
2. Eine gute Pharmakokinetik
 - Aufnahme des Arzneistoffes → Resorption
 - Verteilung im Körper → Distribution
 - biochemischer Um- und Abbau → Metabolisierung
 - Ausscheidung → Exkretion
3. Keine oder geringe Toxizität
4. Angriff verschiedener Protein Targets (eine Resistenzentwicklung würde erst nach der Manifestation multipler Mutationen eintreffen, was zu Voraussetzung 5 führt)
5. Eine geringe Rate der Resistenzentwicklung (95).

Auf der Suche nach Substanzen, die möglichst alle Kriterien erfüllen, wurden in dieser Arbeit vier verschiedene Assays entwickelt und etabliert. Drei der entwickelten Assays wurden für die Suche (Screening) nach neuen Wirkstoffen eingesetzt. Für das parallele Screening vieler Substanzen haben sich Mikrotiterplatten bewährt, die in verschiedenen Ausführungen vorliegen. Weitere hilfreiche Utensilien sind Mehrkanalpipetten, Pipettierroboter und Messgeräte, die in der Lage sind, Absorption oder Fluoreszenz in den verschiedenen Formaten zu messen.

Wahl des *V. cholerae* Stammes

Bei der Entwicklung der vier Assays wurden ausschließlich *V. cholerae* Stämme eingesetzt, die zu den humanpathogenen Serotypen O1 oder O139 gehören. Für den Wachstumsassay und die Suche nach wachstumsreduzierenden Substanzen wurde der *V. cholerae* Reporterstamm MO10 pG13 gewählt, der vom indischen Projektpartner am NICED hergestellt wurde. Der parentale Stamm MO10 gehört zum Serotyp O139, der die achte Pandemie induzierte (22). Der Vektor pG13 trägt neben einem Kanamycinresistenzgen für die Selektion, das *gfp* Gen, kodierend für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP). GFP wird oft als Marker anderer Proteine genutzt, um

die Expression des erwünschten Gens zu detektieren (42, 51). Dafür wird das *gfp* Gen hinter den Promoter des gewünschten Gens kloniert und in das bakterielle Genom integriert. Sobald die Expression des gewünschten Gens induziert wird, erfolgt auch die Expression des GFP-Markers. Der pG13 Vektor enthält die G13 Promotorsequenz, die im pFPV27 Vektor upstream des mGFP Gens ligiert wurde (96). Bei G13 handelt es sich um einen Promoter aus *Mycobacterium marinum*, der für die konstitutive Produktion von GFP genutzt wird. Um die Wachstumsrate zu bestimmen, wurden die Fluoreszenz (Emissionswellenlänge 535 nm bei Anregungswellenlänge 485 nm) und die Absorption bei 600 nm detektiert. Die Evaluierung aktiver Substanzen aus dem Screening wurde mit den Wt Stämmen N16961 und NM06-058 durchgeführt. Beide gehören zum El Tor Biotyp des Serotyps O1.

Wachstumsassay in Mikrotiterplatten

MO10 pG13 wurde auf LB-Kan-Agarplatten angezogen. Für das Screening wurde eine ü. N. Kultur im LB-Medium ohne Kanamycin angesetzt. Das Screening erfolgte im LB-Medium, einem Standardmedium bei Arbeiten mit Enterobacteriaceae. Eine etwas modifizierte Form des LB-Mediums mit 30 g/l NaCl wird in der Regel zur Isolierung von marinen *Vibrio* Arten verwendet (97). Für das eigentliche Screening wurde die Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Für die Durchführung des Screenings in 96-Well-MTPn wurden 50 µl steriles LB-Medium vorgelegt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden mittels Roboter zugegeben. Im Anschluss folgte die Zugabe von 50 µl der bakteriellen Suspension (Startinokulum OD₆₀₀ 0,1). Das Startinokulum wurde so gewählt, dass zu Beginn des Assays kein augenscheinlich erkennbares Wachstum zu sehen war, jedoch nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, ein starkes Wachstum gemessen werden konnte. Das Assay-Volumen in 384-Well-MTPn betrug jeweils 50 µl, und in den 96-Well-MTPn 100 µl pro Well. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert. Gemessen wurde sowohl die optische Dichte bei 600 nm, als auch die Fluoreszenzemission bei 535 nm nach Anregung bei 485 nm. Um ein eindeutiges Ergebnis zu bekommen, wurden beide Messungen verglichen (siehe Abbildung 10). Das Screening erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Wells. Die Kontrollmessungen befanden sich auf jeder Screeningplatte, bei 96-Well-MTPn in Spalte 12, bei 384-Well-MTPn in den Spalten 23 und 24. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen DMSO (max. 1 %), in dem auch die Substanzen vorlagen, zugegeben. Da die Peptide der Peptidsammlungen in einem Gemisch aus Isopropanol und Wasser in einem Verhältnis 1:1 vorlagen, wurde bei dem Screening dieser Sammlungen als Negativkontrolle das genannte Gemisch eingesetzt. Mit diesen Kontrollen sollten Effekte des Wachstums, die durch das Lösungsmittel hervorgerufen wurden, erfasst und in die Auswertung einbezogen werden. Als Positivkontrolle wurde das Antibiotikum

Ergebnisse und Diskussion

Ciprofloxacin gewählt, gegen das alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten *V. cholerae* Stämme sensitiv waren (Daten nicht gezeigt).

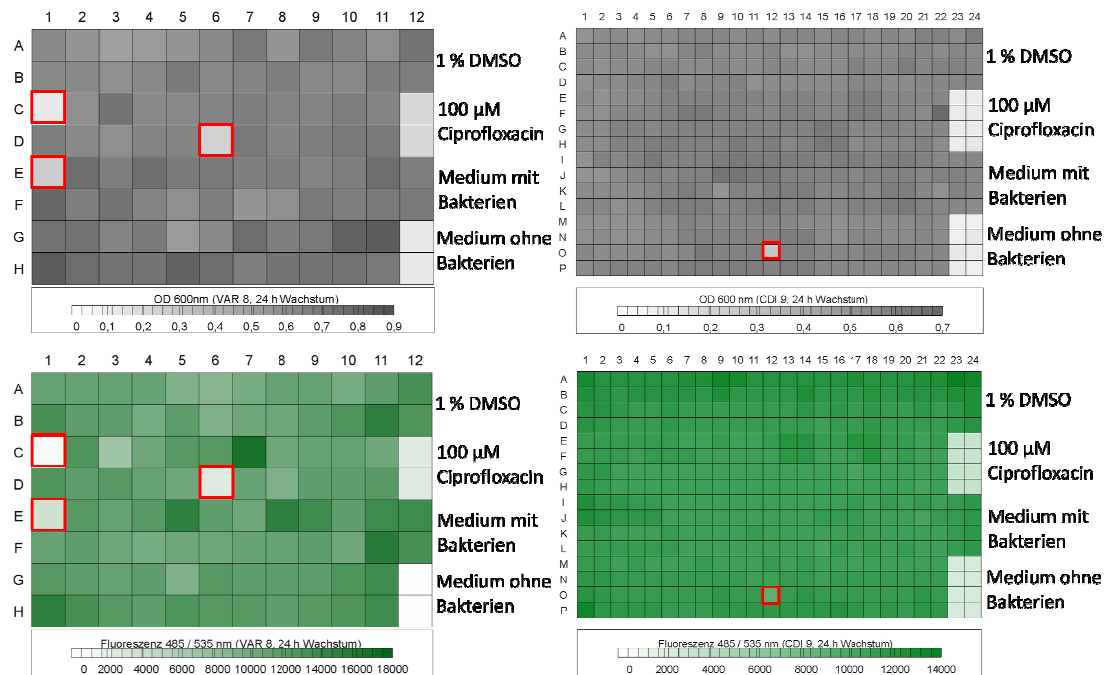


Abbildung 10: Screeningplatten für die Suche nach Wachstum-inhibierenden Substanzen im 96- und 384-Well Format.

Negativ- und Positivkontrollen befinden sich in den Spalten 12 bzw. 23 und 24. Wells mit Substanzen, die das Wachstum um mind. 50 % reduzieren sind rot gekennzeichnet.

Um eine Aussage über die Qualität eines Assays treffen zu können, wurde der Z'-Faktor berechnet. Hierbei handelt es sich um einen statistischen Wert, der in Hochdurchsatz-Screenings genutzt wird, um die Verlässlichkeit eines Assays zu errechnen (98). Mit Hilfe der Mittelwerte der Negativ- und Positivkontrollen und deren Standardabweichungen ließ sich dieser Faktor mit der Formel in Abbildung 11 errechnen. Der maximal mögliche Wert beträgt 1 und steht für einen idealen Assay. Werte zwischen 1 und 0,5 weisen auf einen exzellenten Assay hin. Werte zwischen 0,5 und 0 stehen für einen grenzwertigen, jedoch akzeptablen Assay. Liegen die Werte unter 0, eignet sich der Assay nicht, aufgrund zu starker Überlappungen der Kontrollwerte (98). Die Werte des Z'-Faktors im Wachstum-Screening lagen zwischen 1 und 0,5, was die Bewertung zuließ, dass dieser Assay stabil und reproduzierbar war.

$$\text{Z'-Faktor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Abbildung 11: Formel zur Berechnung des Z'-Faktors. Quelle: Zhang et al., 1999 (98).

σ entspricht der Standardabweichung der Positiv- (p) und Negativkontrollen (n). μ ist der Mittelwert dieser Kontrollen.

3.1.2. Screening verschiedener Substanzsammlungen im Wachstumsassay

Sechs Substanzsammlungen mit insgesamt über 28.000 Verbindungen wurden im Screening nach wachstumsinhibitorischen Wirkstoffen getestet. Dabei wurden initiale Konzentrationen von 20 bis 40 μM eingesetzt, je nach Stammlösung-Konzentration der Substanzen in den Screeningplatten. Dabei handelte es sich um diverse Substanz- sowie Peptidbibliotheken. Alle Sammlungen wurden von der Gruppe Chemische Biologie am HZI zur Verfügung gestellt.

1. Die NCH-Sammlung bestand aus 146 Substanzen und wurde im Laufe mehrerer Jahre in der Abteilung Naturstoffbiologie des HZI im Rahmen von Forschungsarbeiten aus Myxobakterien isoliert (99). Alle Substanzen dieser Sammlung sind Sekundärmetabolite aus Myxobakterien und sind per se nicht essentiell für das Wachstum dieser Organismen. Viele dieser Substanzen haben Wirkmechanismen, die bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (pM- und nM-Bereich) auftreten. Zum Beispiel zeigt Disorazol A₁ eine antimitotische und antimykotische Aktivität. Mit einem IC₅₀-Wert von 3 pM inhibiert Disorazol A₁ metabolische Aktivitäten von L929-Zellen hoch effektiv (100). Eine Erklärung für die hocheffektiven Aktivitätsbereiche ist mit dem Ursprung der Substanzen zu begründen, denn im Zuge natürlicher Selektion kann die Synthese biologisch aktiver Moleküle einzelnen Organismen einen Vorteil verschaffen (Evolution). Für die Wirkstoffforschung ist die Untersuchung der Aktivitäten solcher Naturstoffe hochinteressant. Ein Beispiel für eine Substanz der NCH-Sammlung, die als Wirkstoff therapeutisch eingesetzt wird, ist das Epothilon, isoliert aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*. Basierend auf Forschungsaktivitäten am HZI wurde ein Derivat des Epothilons 2007 in den USA als Antikrebsmittel unter dem Handelsnamen Ixempra auf den Markt gebracht (101, 102).

2. Die VAR-Sammlung (*VARious sources*) bestand zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit aus etwa 2.900 Substanzen und ist wie die NCH-Sammlung nur am HZI verfügbar. Sie beinhaltet Verbindungen, die durch Kollaboration mit verschiedenen Synthese-Chemikern in die HZI-Substanzsammlung aufgenommen wurden. Die

Sammlung enthält sowohl chemisch-synthetische Verbindungen als auch Naturstoffe, die aus Organismen wie Pilzen oder höheren Pflanzen isoliert wurden.

3. Die drei getesteten Peptidbibliotheken enthielten jeweils 361 verschiedene AS-Kombinationen. Zwei der Bibliotheken enthielten lineare Peptide mit einer Kettenlänge von acht Aminosäuren, jeweils in D- bzw. L-Konfiguration. Die dritte Bibliothek enthielt zyklische Peptide mit der Kettenlänge von sieben Aminosäuren in der D-Konfiguration. Die in dieser Arbeit untersuchten Bibliotheken entstanden durch chemische Synthese, eine molekularbiologische Generierung von Peptidbibliotheken ist ebenfalls möglich (103).

Bei der chemischen Synthese werden die Anzahl der Bausteine (z. B. alle 20 proteinogenen Aminosäuren), die Peptidlänge, sowie die Konformation (linear oder zyklisch) festgelegt. Basierend auf dieser Festlegung können alle kombinatorisch möglichen Variationen synthetisiert werden. So ergeben sich beispielsweise bei Verwendung aller 20 Aminosäuren und einer Peptidlänge von sieben Aminosäuren $20^7 = 1,28 \times 10^9$ Kombinationen. Die in dieser Arbeit gescreenten Peptide hatten eine Länge von sieben bzw. acht Aminosäuren, wobei die mittleren zwei Positionen definiert waren, so dass sich für diese definierten Positionen $20^2 = 400$ Kombinationen ergaben. Da die anderen Positionen nicht definiert waren, ergab sich für jede der 400 Kombinationen eine Subbibliothek bestehend aus einem Peptid-Gemisch diverser Abfolgen. Bei Testung solcher Bibliotheken im Screeningverfahren können die Varianten bzw. die Subbibliotheken mit der höchsten Aktivität identifiziert werden. Gegebenenfalls können dann weitere definierte Abfolgen der Subbibliotheken erstellt und somit die aktivste Variante systematisch identifiziert werden. Eine Identifizierung der Sequenz aktiver Peptide ist zudem durch Edman-Abbau möglich. Die zyklische Peptidbibliothek enthielt hingegen Sequenzen, die neben den beiden definierten AS-Kombinationen nur Alanine beinhalten.

4. Die LOPAC-Sammlung (*Library of Pharmacologically Active Compounds*) ist kommerziell erhältlich bei der Firma Sigma-Aldrich und besteht aus 1408 bekannten pharmakologisch aktiven Substanzen. Unter diesen befinden sich Substanzen, die als zugelassene Medikamente auf dem Markt sind oder im Rahmen von klinischen Studien evaluiert wurden. Verschiedene Wirkmechanismen / Targets werden mit den enthaltenen Substanzen adressiert wie Apoptose, Genregulierung & Expression, G-Proteine & zyklische Nukleotide oder Ionenkanäle.

5. Die EMC-Sammlung (*Echaz Microcollections*) ist ebenfalls eine kommerziell erhältliche Sammlung der Firma EMC Microcollections GmbH. Sie besteht aus 7.200 kombinatorisch hergestellten organischen Substanzen.

6. Die CDI-Sammlung (*Chemical Diversity Lab*) von der Firma Chemical Diversity Lab, Inc. besteht aus etwa 17.000 organischen Substanzen, die überwiegend durch kombinatorische Synthese erzeugt wurden. Enthalten sind aber auch einige bereits bekannte pharmakologisch aktive Verbindungen, u. a. antibiotisch wirkende Substanzen.

Die Abbildung 12 stellt eine Übersicht des gemessenen relativen Wachstums zu der DMSO-Kontrolle unter Einfluss der Substanzen dar.

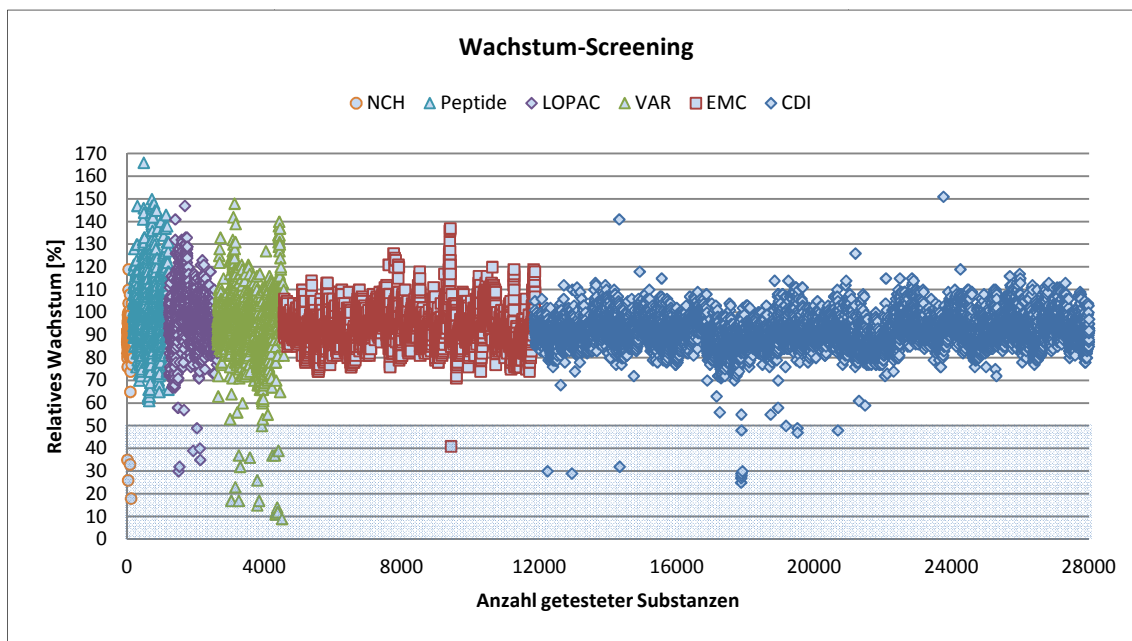


Abbildung 12: Relatives Wachstum des Reporterstamms MO10 pG13.

Markierungen im blauen Bereich entsprechen den Substanzen, die beim initialen Screening eine Reduktion des Wachstums um mindestens 50 % bewirkten.

Der überwiegende Teil der Substanzen hatte keinen Einfluss auf das relative Wachstum, welches zwischen 80 und 110 % lag. Einige Substanzen schienen das Wachstum anzuregen, diejenigen von Interesse reduzierten das relative Wachstum. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht über die Anzahl von Substanzen der einzelnen Substanzsammlungen, die im initialen Screening das Wachstum um mindestens 50 % reduzierten. Dieser Schwellenwert wurde individuell festgelegt um die Anzahl der aktiven Substanzen auf ein praktikables Maß zu limitieren und ein sinnvolles Weiterarbeiten zu ermöglichen.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Wachstum reduzierenden Substanzen.

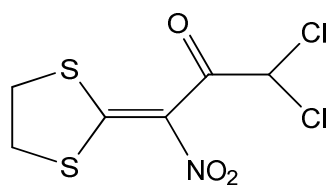
Sammlung	Anzahl Substanzen \leq 50 % Wachstum					Σ
	50–40 %	40–30 %	30–20 %	20–10 %	10–0 %	
NCH	0	2	1	2	0	4
Peptide	0	0	0	0	0	0
LOPAC	2	4	0	0	0	6
VAR	1	5	2	8	1	17
EMC	1	0	0	0	0	1
CDI	5	3	5	0	0	13
						41

Eine Gesamtanzahl von 41 aktiven Substanzen wurde während des initialen Screenings mit nur einer getesteten Konzentration in Einzelbestimmung ermittelt.

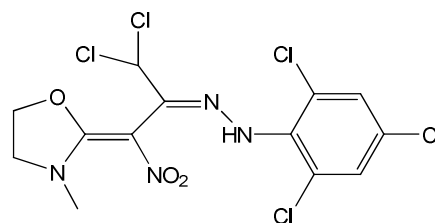
3.1.3. Aktive Substanzen im Wachstumsassay

Während des initialen Screenings reduzierten 41 Substanzen das Wachstum um mindestens 50 %. Diejenigen Platten, die mindestens einen solchen Hit enthielten, wurden erneut im Screening eingesetzt. Nach dieser wiederholten Testung wurden einige der Substanzen aufgrund zu geringer oder bereits bekannter antibakterieller Aktivität aus der Liste der Hits entfernt. Besonders die CDI-Sammlung enthielt einige bekannte Antibiotika, z. B. Ofloxacin und Ofloxacin-Derivate, die im Screening zuverlässig identifiziert wurden. Diese Tatsache war ein weiterer Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des Assays.

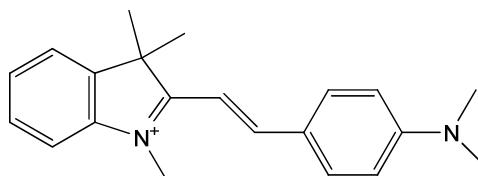
Ein wichtiges Kriterium für die Identifizierung von aussichtsreichen Wirkstoffen war die Aktivität im unteren μ molaren oder noch besser im nmolaren Bereich. Durch wiederholtes Testen der ursprünglich identifizierten Kandidaten bei verschiedenen Konzentrationen und weitere Evaluierungsschritte, wie der MHK-Bestimmung und dem Zytotoxizitätstest, wurde die Zahl der potenten antimikrobiell wirkenden Substanzen auf drei Verbindungen eingegrenzt. In Abbildung 13 sind die Strukturformeln dieser Verbindungen dargestellt. Um sicherzustellen, dass sich die in DMSO gelösten Substanzen während der Lagerungsperiode nicht verändert haben, wurden in der Abteilung Strukturbiologie des HZI durch MALDI- und ESI-Massenspektrometrie und / oder NMR-Messungen Strukturanalysen durchgeführt. Für alle drei Substanzen stimmten die Ergebnisse mit den Erwartungen überein. Die gefundenen Aktivitäten wurden demnach von den Originalstrukturen hervorgerufen.



vz0500 (VAR, Prof. Kaufmann)



vz0825 (VAR, Prof. Kaufmann)



1541-0004 (CDI)

Abbildung 13: Codes, Hersteller und Strukturformeln der aktiven Substanzen im Wachstumsassay.

Um festzustellen ob die vorliegenden Strukturen bereits bekannte antimikrobielle Aktivitäten besitzen, wurden sie in der Datenbank „SciFinder“ recherchiert. Die Substanzen vz0500 und vz0825 wurden im Zusammenhang mit antibakterieller Wirkung, bis zum Zeitpunkt der Schriftlegung dieser Arbeit, noch nicht erwähnt. Für eine Verbindung mit einer Struktursimilarität von 65 % zu vz0500 wurden pestizide Eigenschaften beschrieben, und für zwei Verbindungen mit einer Struktursimilarität von 61 % sind insektizide Eigenschaften bekannt. Für vz0825 fand sich nur eine Verbindung mit einer Struktursimilarität von 60 %, die zu den Insektiziden gehörte. Die Substanz 1541-0004 gehört zu der Gruppe der Styryl-Farbstoffe, die im Zusammenhang mit antimikrobieller Aktivität gegen *Xanthomonas oryzae*, einem auf Reispflanzen Braunfäule verursachenden Bakteriums, bereits 1966 beschrieben wurden (104).

3.1.4. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Die Aktivität von antibakteriellen Wirkstoffen kann sowohl zwischen den verschiedenen Bakterienarten, sowie innerhalb einer Art stark variieren. Die Bestimmung der MHK- und MBK-Werte erfolgte nach dem Protokoll für „Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika“ nach DIN 58940-7 (92). Man unterscheidet bei antibakteriellen Wirkstoffen zwischen bakteriostatischen und bakteriziden Effekten. Dabei steht MHK für die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der die Vermehrung von Mikroorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann. Diese Art der Wachstumsreduktion könnte u. U. durch bakteriostatische oder bakterizide Wirkung

Ergebnisse und Diskussion

hervorgerufen werden. Bei bakteriostatischer Wirkung sind die Bakterien bei einem Entfernen der Substanz aus dem Medium in der Lage, ihr Wachstum erneut aufzunehmen. MBK beschreibt hingegen die geringste Konzentration einer Substanz, die nötig ist 99,9 % aller Bakterien nach 6-stündiger Einwirkzeit abzutöten. Für die Generierung der MHK- und MBK-Werte, sowie für die weitere Evaluierung der aktiven Substanzen, wurde mit zwei *V. cholerae* Wt Stämmen gearbeitet. Verwendet wurde zum einen der Stamm N16961, der zu dem El Tor Biotyp gehört und Verursacher der siebten Pandemie (1961 bis heute) ist (105), und NM06-058, ebenfalls ein El Tor Stamm. NM06-058 wurde 2006 am NICED isoliert und uns im Rahmen dieses Projekts zur Verfügung gestellt. Somit lagen zwei pathogene Stämme vor, die im Abstand von etwa 40 Jahren zu einer Cholera-Erkrankung geführt haben. Abbildung 14 zeigt das Wachstum beider Stämme bei Zugabe verschiedener Konzentrationen der Substanzen vz0500, vz0825 und 1541-0004.

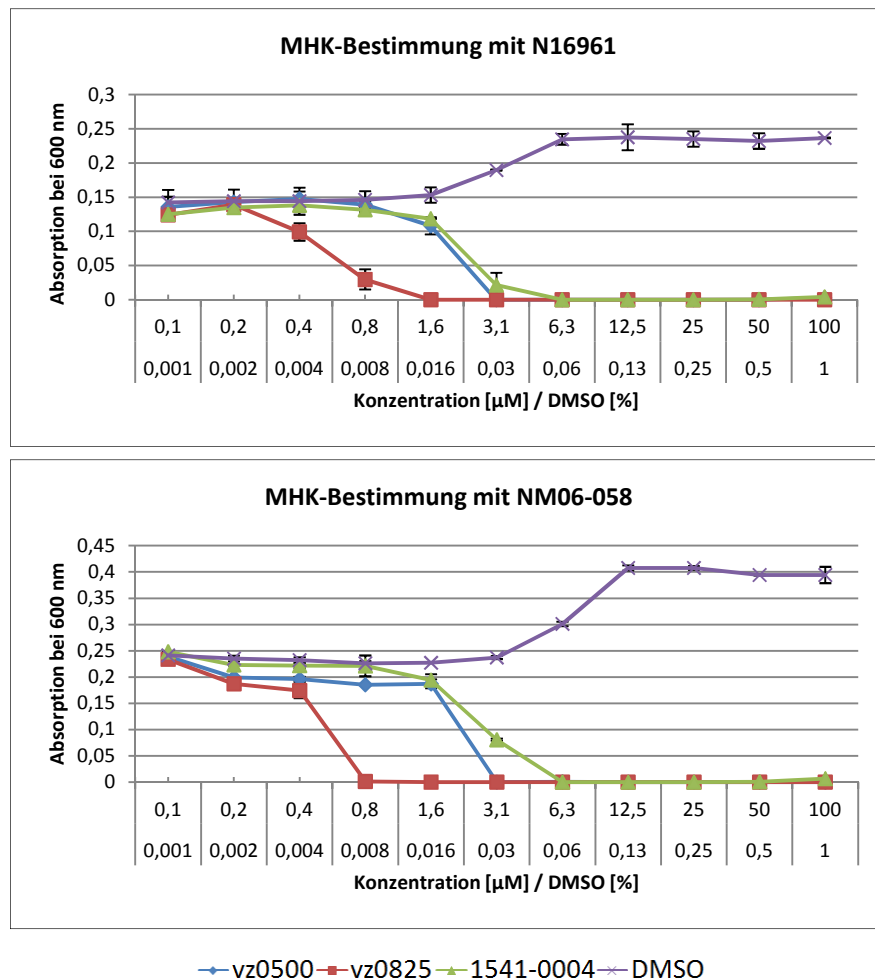


Abbildung 14: MHK-Bestimmung für die Substanzen vz0500, vz0825 und 1541-0004.

Bestimmung mittels zweier pathogener *V. cholerae* Stämme, DMSO dient dem Kontrollwachstum. Messung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

Alle drei Substanzen reduzierten das Wachstum um nahezu 100 % bei Konzentrationen im einstelligen μM -Bereich. vz0825 war die aktivste antibakteriell wirkende Substanz, die während des Screening gefunden wurde. Wie bei der DMSO Kontrolle zu sehen ist, wurde das Wachstum im Bereich 0,06 % bis 1 % DMSO induziert.

Parallel zu der Bestimmung der MHK-Werte wurden die MBK-Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Substanzen ermittelt (Versuchsprotokoll siehe 2.2.3). In Tabelle 19 ist eine Zusammenfassung der ermittelten Werte dargestellt.

Tabelle 19: Übersicht der MHK- und MBK-Werte von vz0500, vz0825 und 1541-0004.

Ermittelt nach verschiedenen Inkubationszeiten der Stämme N16961 und NM06-058 mit den aktiven Substanzen.

Stamm		Inkubations-zeit	vz0500 [μM]	vz0825 [μM]	1541-0004 [μM]
N16961	MBK	2 h	50	50	50
		6 h	6,3	12,5	6,3
		24 h	6,3	6,3	6,3
	MHK	24 h	3,1	1,6	6,3
NM06-058	MBK	2 h	50	50	6,3
		6 h	6,3	12,5	6,3
		24 h	6,3	1,6	6,3
	MHK	24 h	3,1	0,8	6,3

Die bakteriziden Konzentrationen beider Stämme lagen für vz0500 und vz0825 etwas höher als die MHK-Werte. Die ermittelten Werte für 1541-0004 waren für beide Stämme identisch. Die Schlussfolgerung ist, dass vz0500 und vz0825 zunächst einen bakteriostatischen Effekt haben, der bei steigender Konzentration in den bakteriziden Bereich übergeht, was einem bekannten Phänomen entspricht. Substanz 1541-0004 inhibiert bei der Konzentration von 6,3 μM nicht nur das Wachstum, sondern tötet bereits bei dieser Konzentration die Bakterien ab.

Für die Ermittlung der antibakteriellen Wirkungsbreite wurden die Substanzen mit weiteren Gram-negativen und Gram-positiven, klinisch bedeutsamen humanpathogenen Keimen getestet. Die meisten getesteten Stämme waren in der Lage unter aeroben Bedingungen im Müller-Hinton Medium zu wachsen. Eine Ausnahme bildete *A. baumannii*, das ein spezifisches Medium benötigte. In Tabelle 20 sind die ermittelten MHK-Werte zusammengefasst.

Tabelle 20: MHK-Werte der Wirkstoffkandidaten für humanpathogene Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.

Substanz	vz0500	vz0825	1541-0004
Gram –	[μM]	[μM]	[μM]
<i>E. coli</i> , ESBL	>> 100	> 100	> 100
<i>E. coli</i> , ETEC	>> 50	>> 50	> 50
<i>K. pneumoniae</i>	> 100	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	>> 100	>> 100	>> 100
<i>S. typhimurium</i>	>> 50	>> 50	>> 50
<i>S. flexneri</i>	>> 50	>> 50	> 50
<i>S. boydii</i>	>> 50	>> 50	> 50
<i>A. baumannii</i>	>> 100	50	> 100
Gram +			
<i>E. faecalis</i>	>> 100	50	> 100
<i>S. aureus</i> , MRSA	100	50	6,3

Die ermittelten MHK-Werte für die unterschiedlichen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien waren sehr hoch oder lagen oberhalb des gemessenen Bereichs. Lediglich Substanz 1541-0004 wies mit dem MHK-Wert von 6,3 μ M eine moderate Aktivität gegen *S. aureus* auf. Außerdem ist eine bereits bekannte antibakterielle Aktivität gegen *Xanthomonas oryzae* bekannt (104). Substanzen vz0500 und vz0825 zeigten einen antibakteriellen Effekt ausschließlich gegen *V. cholerae*. Aufgrund der Tatsache, dass eine begrenzte Anzahl humanpathogener Bakterien getestet wurde, können Aktivitäten gegen weitere Bakterien nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die gefundene Aktivität aber auf Vibrionen und ggf. auf *V. cholerae* beschränkt.

3.1.5. Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test

Substanzen, die antibakteriell wirken, können u. U. einen ungewollten zytotoxischen Effekt auf eukaryotische Zellen haben. Um festzustellen, ob die hier entdeckten Wirkstoffe eine toxische Wirkung auf eukaryotische Zellen haben, wurde der MTT-Test durchgeführt. Der Nachweis einer Zytotoxizität oder Wachstumshemmung erfolgt beim MTT-Test durch die Bestimmung der Zahl lebender Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle. Dabei wirkt sich die Aktivität verschiedener Stoffwechselwege unter Einfluss der Testsubstanzen auf die Vitalität der Zellen aus. Die zu untersuchenden Substanzen werden als Lösungen zu Zellkulturen gegeben, bei denen anschließend

die zellphysiologischen Auswirkungen analysiert werden. Zur Verfügung stehen neben verschiedenen permanenten Zelllinien und Tumorzellen auch primäre Zellen.

Bei dem hier angewandten MTT-Test wurden L929-Mausfibroblast-Zellen verwendet. Diese permanente Zelllinie ist einfach zu kultivieren, wird routinemäßig in Toxizitätstests eingesetzt und ist somit ein sensibles *in vitro* Testsystem für die Bioverträglichkeitsprüfung von Wirkstoffen. Die Zellen werden *in vitro* mit dem Farbstoff MTT behandelt. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Im Rahmen dieser Versuche wurde nach einer 24-stündigen bzw. 5-tägigen Inkubation der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz, der Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zu der MeOH-Kontrollprobe bestimmt. Nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Wirkstoff wurde die akute Toxizität der Verbindung bestimmt, wobei nach der 5-tägigen Inkubation mehr die Zellproliferation und die subakute Toxizität in den Fokus rückte. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) gibt an, bei welcher Konzentration der Testsubstanzen von den Zellen 50 % des MTT zu Formazan umgesetzt werden konnte. Für die drei aktiven Substanzen wurden Verdünnungsreihen angesetzt und mit den L929-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

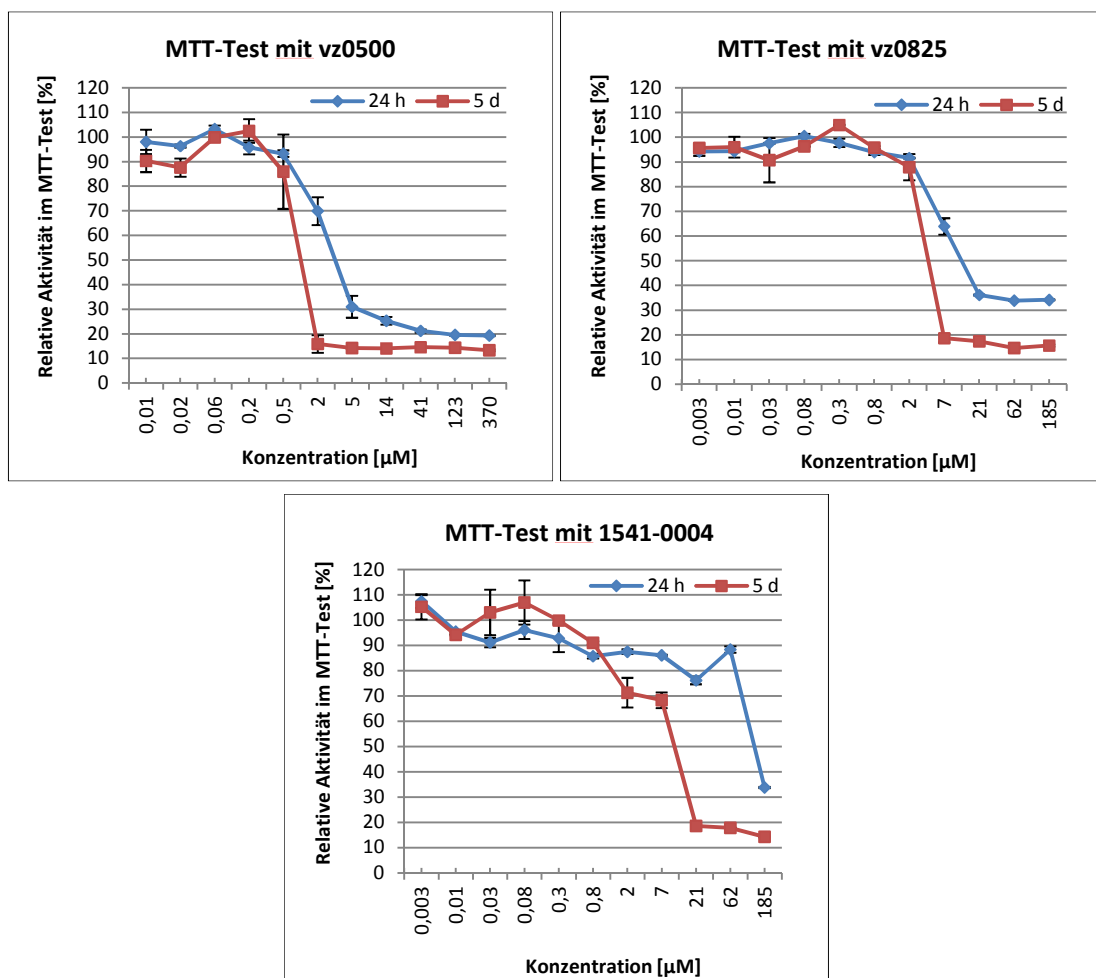


Abbildung 15: Zytotoxizität der Substanzen vz0500, vz0825 und 1541-0004 in L929-Zellen.

Um ein möglichst breites Spektrum der Konzentrationen testen zu können, wurde eine serielle Verdünnung (Verdünnungsfaktor 1:4) eingesetzt. Alle drei Substanzen wiesen im getesteten Bereich eine deutliche Toxizität auf.

In Tabelle 21 sind die ermittelten IC_{50} -Werte zusammengefasst.

Tabelle 21: IC_{50} -Werte des MTT-Tests ermittelt in L929-Zellen.

Substanz	IC_{50} -Werte aus MTT-Test [µM]	
	24 h	5 d
vz0500	3	1
vz0825	14	6
1541-0004	170	14

Der ermittelte IC_{50} -Wert von vz0500 nach 24-stündiger Inkubation entsprach dem MHK-Wert bei Verwendung des *V. cholerae* Stammes N16961 (siehe Tabelle 19). Im Fall von vz0825 lagen der IC_{50} -Wert und der MHK-Wert um den Faktor 9 auseinander. Bei der Substanz 1541-0004 beträgt der Faktor etwa 27. Für eine therapeutische Verwendung sollten der MHK- und der IC_{50} -Toxizitätswert möglichst weit auseinander liegen. Besonders für antimikrobielle Substanzen sollte dieser Faktor 100 oder mehr betragen. Bei der Therapie bakterieller Erkrankungen versucht man ganz spezifisch den Erreger zu treffen, dazu werden Mechanismen genutzt, z. B. Biosynthesewege, die beim Menschen in identischer Form nicht vorhanden sind oder keine wichtige Rolle spielen. So lässt sich die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen von Beginn an minimieren. Da antibiotisch wirkende Substanzen bakterielle Zelle beeinflussen, z. B. die Zellwandbiosynthese oder Hemmung der Proteinbiosynthese, besteht für den menschlichen Organismus keine akute Gefahr. Bevor jedoch eine endgültige Aussage über die Verträglichkeit eines Wirkstoffs getroffen werden kann, müssen ausgiebige Toxizitätstest *in vivo* in Tiermodellen durchgeführt werden. Routine ist die Bestimmung der akuten Toxizität an mehreren Tierarten, sowie die Bestimmung der chronischen Toxizität an mindestens zwei Tierarten vor Eintritt in die klinische Prüfung, Phase I, die Verträglichkeitsprüfung am freiwilligen, gesunden Probanden. Dabei gilt der Standard, dass die Spezies für chronische Toxizitätsuntersuchungen vor allem danach ausgesucht werden, welche Tierarten bei der entsprechenden Substanz in ihrer Pharmakokinetik und ihrem Metabolismus dem Menschen am ähnlichsten stehen (106). Durch Screeninguntersuchungen kann nicht erwartet werden, dass aktive Substanzen auf Anhieb die idealen Eigenschaften eines Pharmakons aufweisen. Aktive Substanzen, oder „Hits“, stellen Leitstrukturen dar und sind oft Ausgangsbasis für Strukturveränderungen, die mit den Methoden der Medizinischen Chemie erzeugt werden. Dabei handelt es sich um eine gängige Methode zur Wirkstoffoptimierung, bei der Modifikationen wie isosterer Ersatz von Atomen oder Gruppen, die Einführung hydrophober Bausteine, das Zerschneiden von Ringen bzw. die Einbindung flexibler Molekülteile in zyklische Strukturen, und die Optimierung des Substitutionsmusters durchgeführt werden können (106). Auf diese Weise können Substanzen mit einem relativ niedrigen IC_{50} -Wert in ihrer Struktur dahingehend modifiziert werden, dass die Aktivität erhöht und die Toxizität reduziert wird. Die folgenden Experimente der Mutantengenerierung wurden allerdings mit den uns vorliegenden Substanzen durchgeführt.

3.1.6. Generierung resistenter Mutanten

Der unsachgemäße und zu breite Einsatz von Antibiotika in der Vergangenheit führte zu einem Selektionsdruck für resistente Stämme. Vor allem sind Kliniken ein Ort für die Entstehung und Verbreitung von resistenten Stämmen. Durch die räumliche Nähe und

Konzentration unterschiedlicher Erreger ist dies praktisch unvermeidbar. Aus klinischer Sicht ist die Suche nach strukturell neuen Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen, insbesondere für die Behandlung multiresistenter Krankheitserreger, dringend erforderlich. Liegt noch kein Hinweis auf den Wirkmechanismus einer aktiven Substanz vor, können zur Aufklärung einige Strategien verfolgt werden. Ein Beispiel ist die zellbasierte High-Content-Analyse, die mit Hilfe der automatisierten Mikroskopie eine Identifizierung von Wirkmechanismen bisher unzureichend charakterisierter Wirkstoffkandidaten, wie z.B. bestimmter Naturstoffe bzw. Naturstoffderivate, möglich macht (107). Für die Analyse des Wirkmechanismus antibakteriell aktiver Substanzen müssen andere Methoden herangezogen werden, z. B. kann der Wirkmechanismus durch einen Vergleich der Musteranalyse des bakteriellen Proteomprofils eines neuen und eines bereits bekannten Antibiotikums aufgeklärt werden (108). Falls das zytosolische Proteomprofil keinem der bereits bekannten Proteomprofile ähnlich ist, werden z. B. Antibiotika-tolerante Stämme genetisch analysiert (Mutation-Mapping).

Im Rahmen dieser Arbeit entschieden wir uns mittels Mutagenese tolerante bzw. resistente *V. cholerae* Mutanten zu generieren, und auf der DNA-Ebene nach Veränderungen des Genoms zu suchen. Bei der konventionellen Mutagenese wird das Erbgut eines Lebewesens nicht gezielt verändert. Dazu werden die Organismen mutagenen, d. h. erbgutverändernden Bedingungen ausgesetzt. Diese reichen von der Bestrahlung (z. B. mit UV-Licht) bis zum Einsatz chemischer Stoffe. Es lässt sich nicht vorhersagen, wo genau es im Genom zu einer Mutation kommt. Stattdessen wird der erwünschte Organismus über ein Screeningverfahren gesucht, z. B. werden nur die mutierten Bakterienkolonien, die auf einem bestimmten Medium wachsen, angezüchtet. Die Detektion der Veränderungen im Mutantengenom und der Vergleich von Sequenzvariationen liefern Informationen über mögliche Targets von Wirkstoffen (109). Dank moderner Verfahren bieten sich Möglichkeiten der beschleunigten Sequenzierung. Die nach der Sanger-Methode entwickelten Sequenzierungsverfahren werden häufig als Sequenzierung der nächsten Generation (*next generation sequencing*) bezeichnet.

Die relativ spezifische Wirkung der identifizierten Hits gegen *V. cholerae* konnte in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20). Um festzustellen auf welche Weise die Substanzen in der Zelle aktiv sind, wurden resistente Mutanten generiert. Für die Zwecke der Mutanten-Generierung wurde eine hohe Anzahl von Bakterien (etwa 10^{10}) auf LB-Agarplatten mit der 5-20fachen MHK-Werte-Konzentration der aktiven Substanzen ausplattiert. Kolonien, die auf den entsprechenden Platten wuchsen, waren Mutanten, die Resistenzen entwickelt hatten. Die Platte mit dem 5fachen MHK-Wert von vz0500 wies nach der ü. N. Inkubation kein Wachstum von Kolonien auf. Die Platte mit dem 5fachen MHK-Wert von vz0825 zeigte

ein Wachstum von etwa 1000 sehr kleinen, durchsichtigen Kolonien. Auf der Platte mit der Substanz 1541-0004 zeigte sich das Wachstum von etwa 50 großen rot gefärbten Kolonien (1541-0004 ist ein roter Styryl-Farbstoff). Jeweils 7 Kolonien wurden von den Selektionsplatten mit vz0825 und 1541-0004 gepickt und erneut auf Selektionsplatten mit dem 5fachen MHK-Werten ausplattiert. Bei der zweiten Selektionsrunde wuchsen nur noch Bakterien auf den vz0825-haltigen LB-Agarplatten. Exemplarisch wurden für 15 der erneut gewachsene Mutante die neuen MHK-Werte bestimmt, die deutlich oberhalb (5-16fach) des MHK-Werts des Wt Stamms lagen. Die Generierung resistenter Mutanten gegen vz0500 und gegen 1541-0004 war mit der beschriebenen Methode nicht erfolgreich. Eingesetzt wurden beide Wt Stämme N16961 und NM06-058. Erfolgreich war die Mutantengenerierung mit NM06-058, einem relativ aktuellen *V. cholerae* Stamm und der aktivsten Substanz des Wachstum-Screenings, vz0825.

Der Wt Stamm und sieben gegen vz0825 resistente Mutanten wurden mit einer Reihe verschiedener exemplarischer Antibiotika getestet, die die wichtigsten therapeutisch adressierbaren Wirkmechanismen umfassen, und u. a. zur Behandlung von Cholera-Infektionen eingesetzt werden. Ampicillin ist ein β -Lactam-Antibiotikum und stört die Zellwandsynthese. Tetracyclin gehört zu der Gruppe der Tetracycline und ist ein 30s-Inhibitor der Proteinsynthese. Ciprofloxacin gehört zu der Gruppe der Fluorchinolone, ist ein Gyrasehemmer und stört die DNA-Replikation. Rifampicin aus der Gruppe der Rifamycine hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase. Chloramphenicol ist ein Breitbandantibiotikum und Translationshemmer, Erythromycin hemmt ebenfalls die Translation und inhibiert somit die Proteinbiosynthese. Sulfamethoxazol aus der Gruppe der Sulfonamide und Trimethoprim stören den Folsäurestoffwechsel. Aus diesem Test könnten sich erste Hinweise auf den Wirkmechanismus von vz0825 ergeben. Dabei wäre das veränderte Wachstumsverhalten einer resistenten Mutante im Vergleich zum Wt Stamm, unter Einfluss eines der oben genannten Antibiotika, ein Hinweis auf Veränderungen des betroffenen Antibiotikum-Targets. Bestimmt wurden MHK-Werte der oben genannten Antibiotika mit dem Wt Stamm NM06-058 und den generierten Mutanten.

Tabelle 22: Aktivitäten ausgewählter Antibiotika

Vergleich der Aktivitäten diverser Antibiotika gegen den Wt Stamm NM06-058 und 7 resistenter Mutanten (Mut.1-Mut.7) gegen vz0825. Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Antibiotikum	MHK-Werte [$\mu\text{g/ml}$]							
	Wt	Mut.1	Mut.2	Mut.3	Mut.4	Mut.5	Mut.6	Mut.7
Ampicillin	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Tetracyclin	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Ciprofloxacin	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	2
Rifampicin	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Chloramphenicol	8	8	8	8	8	8	8	8
Erythromycin	2	4	2	2	2	2	4	2
Sulfamethoxazol	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
Trimethoprim / Sulfamethoxazol	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152	> 8 / 152

Wie die Ergebnisse in Tabelle 22 darstellen, war das Wirkspektrum der getesteten Antibiotika bei den resistenten Mutanten identisch zum Wt Stamm. Das ist ein Hinweis darauf, dass Substanz vz0825 einen therapeutisch bisher nicht genutzten Wirkmechanismus aufweist. Um das molekulare Target von vz0825 zu identifizieren, wurden Genomanalysen der Mutanten in Form von Gesamtgenom-Sequenzierungen durchgeführt.

3.1.7. Gesamtgenom-Sequenzierung

DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotidabfolge in einem DNA-Molekül, in diesem Fall des gesamten Wt Genoms vom *V. cholerae* El Tor Stamm NM06-058 und eines Genompool aus 15 resistenten Mutanten.

Paired-End Sequenzierung

Als Methode wurde die Paired-End Sequenzierung verwendet. Um aus den Proben DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe zu gewinnen, wurde diese zunächst mittels Ultraschall in etwa 300 bp lange Fragmente zerkleinert. Für die so gewonnenen DNA-Fragmente erfolgte anschließend die eigentliche Sequenzierung mittels Genome Analyzer IIx mit „Paired-End“ Modul. Sowohl die Probenvorbereitung als auch die Sequenzierung wurden in der AG Genomsequenzierung des HZI (Leitung Dr. Robert Geffers) durchgeführt. Dieser Vorgang der Sequenzierung beruht auf mehreren Einzelschritten, die sich in drei Hauptarbeitsschritte unterteilen lassen (siehe Abbildung 16).

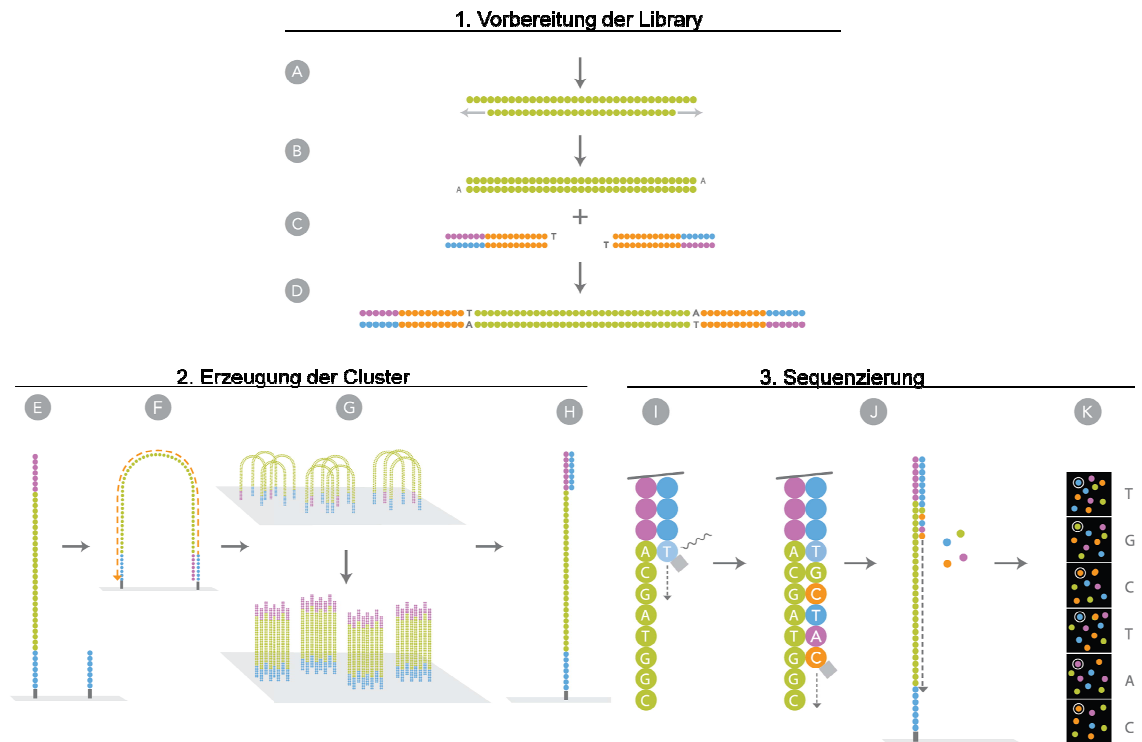


Abbildung 16: Paired-End Sequenzierung. Quelle: Illumina, 2010 (110).

A) DNA-Fragment; B) Reparatur der DNA-Fragmente und Anfügen des Adeninüberhangs; C) Adapterbindung; D) Auswahl gebundener DNA; E) Anheften der DNA an die Flow Cell; F) Brückenamplifikation; G) Clusterbildung H) Anlagerung des Primers; I) erste Basenverlängerung, Auslesen und Entblocken; J) vorherigen Schritt für Strangverlängerung wiederholen; K) Basen auslesen.

Schritt eins ist die Vorbereitung einer sogenannten DNA-Bibliothek „Library“ (siehe Abbildung 16 A-D). Hier werden zunächst die Enden der 300 bp langen DNA-Fragmente geglättet und phosphoryliert, sowie ein Adeninüberhang angefügt, an welchen schließlich die Adaptern ligiert werden. Mit den Adaptern haben die Fragmente eine Länge von 450 bp. Danach wird eine Amplifikation mittels einer PCR durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass die darauffolgenden Arbeitsschritte nur für DNA-Fragmente durchgeführt werden, die zu der gewünschten Region gehören, erfolgt als Zwischenschritt die Hybridisierung auf einem speziellen Array mit für diese Region spezifischen Oligonukleotiden. Im Anschluss werden die freien DNA-Fragmente durch Waschen entfernt und schließlich die Gebundenen bei hohen Temperaturen eluiert und erneut mittels PCR vervielfältigt. Als zweiter Hauptarbeitsschritt folgt dann die Erzeugung der „Cluster“ (siehe Abbildung 16 E-H), bei dem die DNA-Fragmente mittels Adapter zunächst an der „Flow Cell“ befestigt werden. Nach Anheften der DNA an die „Flow Cell“ kommt es zur Brückenbildung und der damit verbundenen Vervielfältigung der DNA, was zur lokal begrenzten Anhäufung von Kopien der einzelnen Fragmente führt, an welche schließlich die Primer angelagert werden. Den letzten Schritt stellt

dann die eigentliche Sequenzierung dar (siehe Abbildung 16 I-K). Hierzu erfolgt die Zugabe von vier verschiedenen, basenspezifisch Fluoreszenz-markierten und für eine weitere Kettenverlängerung blockierten Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP). Während jedes Durchgangs der Sequenzierung wird nur ein dNTP an die jeweilige Nukleinsäurekette angefügt, da die Markierungen zum Stoppen der Polymerisation führen. Anschließend wird die Farbe der Fluoreszenz bei allen „Clustern“ parallel ermittelt und so die eingebaute Base eines jeden „Clusters“ identifiziert. Da diese Technologie bereits während der Synthese der DNA-Stränge ihre Sequenz bestimmt, wird sie „sequencing by synthesis“ oder kurz SBS genannt. Um einen weiteren Zyklus der Sequenzierung zu ermöglichen, werden dann der Fluoreszenzmarker und die Schutzgruppe am 3'-OH enzymatisch abgespalten, so dass das nächste Nukleotid eingegliedert werden kann. Dieser Vorgang wird schließlich so oft wiederholt, bis die gewünschte vorher festgelegte Leseweite (hier 75 bp) erreicht ist. Die so gewonnenen Sequenzen werden dann mit der Referenzsequenz abgeglichen. Dabei wird bei der „Paired-End“ Sequenzierung die Genauigkeit dieses Abgleichs dadurch verbessert, dass für beide Enden der sequenzierten Fragmente die entsprechenden Sequenzen in der Referenzsequenz in einer bestimmten Distanz gefunden werden müssen und so die Lage der Fragmente im Genom zweifach abgesichert wird.

Auswertung der Genompool-Sequenzierung

Die Methode der Genompool-Sequenzierung wird genutzt zur Analyse von hochkonservierten Genombereichen (109), oder der Suche nach veränderten Bereichen eines Genoms (111). Die Aufklärung von Wirkmechanismen ist ein schwieriger Prozess, verbunden mit hohem Zeitaufwand, Kosten und nicht immer erfolgreichem Ergebnis. Die Genompool-Sequenzierung stellt eine innovative Möglichkeit zur Aufklärung von Wirkmechanismen dar, die bisher nur wenig genutzt wurde, z. B. bei der Aufklärung von Wirkmechanismen in *Pseudomonas aeruginosa* (Häußler *et al.*, Publikation in Vorbereitung).

Das Genom des Wt Stamms NM06-058 und eines Genompool von 15 gegen vz0825 resistenten Mutanten wurde mit der 75 bp Paired-End Methode vollständig sequenziert. Die statistischen Werte der Sequenzierung sind in Tabelle 23 aufgeführt. Nur ein geringer Anteil aller sequenzierten Fragmente von 6,1 % bei der Wt Genomsequenzierung und 2,8 % bei der Genompool-Sequenzierung konnte bei der folgenden Annotation nicht in die richtige Position des Genoms eingeordnet werden.

Tabelle 23: Zusammenfassende Statistik der Genomsequenzierung des Wt Genoms und des Genompools.

	Anzahl der Fragmente	durchschnittliche Länge [bp]	Gesamtzahl der Basen
Wt Genom			
Fragmente	11.260.864	76	855.825.664
identifiziert	10.574.557 (93,9 %)	76	803.666.332
nicht-identifiziert	686.307 (6,1 %)	76	52.159.332
Genompool			
Fragmente	35.196.596	72,36	2.546.713.435
identifiziert	34.210.563 (97,8 %)	72,43	2.477.950.102
nicht-identifiziert	986.033 (2,8 %)	69,74	68.763.333
Referenz	2	2.016.732	4.033.464

Die Sequenzdaten des Genome Analyzers Ilx wurden zunächst in das FastQ-Format transformiert. Das Mapping des Wt Genoms und des Genompools erfolgte jeweils gegen den annotierten Wt Stamm N16961, dessen Genom bereits sequenziert und publiziert wurde (45). Beide Stämme, N16961 und NM06-058, gehören zum Serotyp O1 und Biotyp El Tor, was die Wahl des annotierten Stamms erklärt. Dieses Mapping war sinnvoll aufgrund der bereits bekannten Gen-Positionen auf dem N16961 Genom. Die Annotation des Wt Genoms von NM06-058 und des Genompools gegen N16961 war aufgrund einiger Unterschiede zwischen den Wt Genomen sinnvoll und erleichterte die Auswertung. Mit der CLC Genomics Workbench V. 4.7.2 Software wurden die SNPs (*single nucleotide polymorphism*) und DIPs (*deletion and insertion polymorphism*) ermittelt. Auf diese Weise konnten SNPs oder DIPs, die gleichzeitig im Wt Genom und Genompool auftreten, herausgefiltert und nur diejenigen Veränderungen betrachtet werden, die ausschließlich im Genompool auftraten. Für die Auswertung wurde ein Algorithmus angewandt mit folgenden Suchkriterien:

1. die Sequenzabdeckung lag bei mind. 30 gelesenen Fragmenten
2. die max. Zahl der Allelvariationen lag bei 2
3. der Schwellenwert der Frequenz einer der Allelvariationen sollte mind. 50 % betragen

In Tabelle 24 (Zeile 1) ist der SNP aufgeführt, der im Genompool der Mutanten unter Berücksichtigung der oben genannten Parameter detektiert wurde. Weitere Mutationen mit einer vergleichbaren Prägnanz wurden nicht detektiert. Weitere SNPs, die in dieser Tabelle aufgeführt sind, befanden sich ebenfalls auf dem betroffenen Gen.

Tabelle 24: SNPs des VC_A0531 Gens.

Ref.pos. steht für Referenzposition, Var.typ steht für Variationstyp, Allelvar. steht für Allelvariation, Seq.abdeck. steht für Sequenzabdeckung, überlapp. Annotat. steht für überlappende Annotation.

	Ref. pos.	Var. typ	Länge	Ref.	Var.	Allel- var.	Frequenz [%]	Zahl	Seq. abdeck.	überlapp. Annotat.
1	469.840	SNP	1	C	3	C / T / (G)	70,4 / 29,1 / (0,5)	437 / 181 / (3)	621	Gen: VC_A0531
2	469.210	SNP	1	T	2	T / C	93,6 / 6,4	653 / 45	698	Gen: VC_A0531
3	470.014	SNP	1	C	3	C / A / (T)	92,6 / 7,2 / (0,2)	528 / 41 / (1)	570	Gen: VC_A0531
4	470.169	SNP	1	G	2	G / A	94,7 / 5,3	551 / 31	582	Gen: VC_A0531
5	470.170	SNP	1	A	3	A / G / (C)	94,4 / 5,4 / (0,2)	557 / 32 / (1)	590	Gen: VC_A0531

Das Gen VC_A0531 befindet sich auf dem zweiten Chromosom von *V. cholerae* und kodiert für eine Sensor-Histidinkinase. Im Genompool trugen etwa 70 % der Mutanten an der entsprechenden Position noch immer das Wt Allel C, wobei etwa 30 %, was 5 von 15 Mutanten entspricht, an Stelle von C ein T enthielten. Ein vernachlässigbar kleiner Teil von 0,5 % trug ein G. In diesem Gen wurden außerdem weitere Punktmutationen detektiert, die eine Frequenz von > 1 % und < 10 % aufwiesen (siehe Tabelle 24 Zeilen 2-5). Werden die Frequenzen der Mutationen addiert, kommt man auf eine Mutationsrate innerhalb dieses Gens von 53,4 %, was bedeutet, dass 8 von 15 getesteten Mutanten eine Mutation im Gen VC_A0531 tragen.

In Abbildung 17 ist ein Vergleich der Wt Sequenz und der Genompool-Sequenz an der Referenzposition 460.840 auf Chromosom 2 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

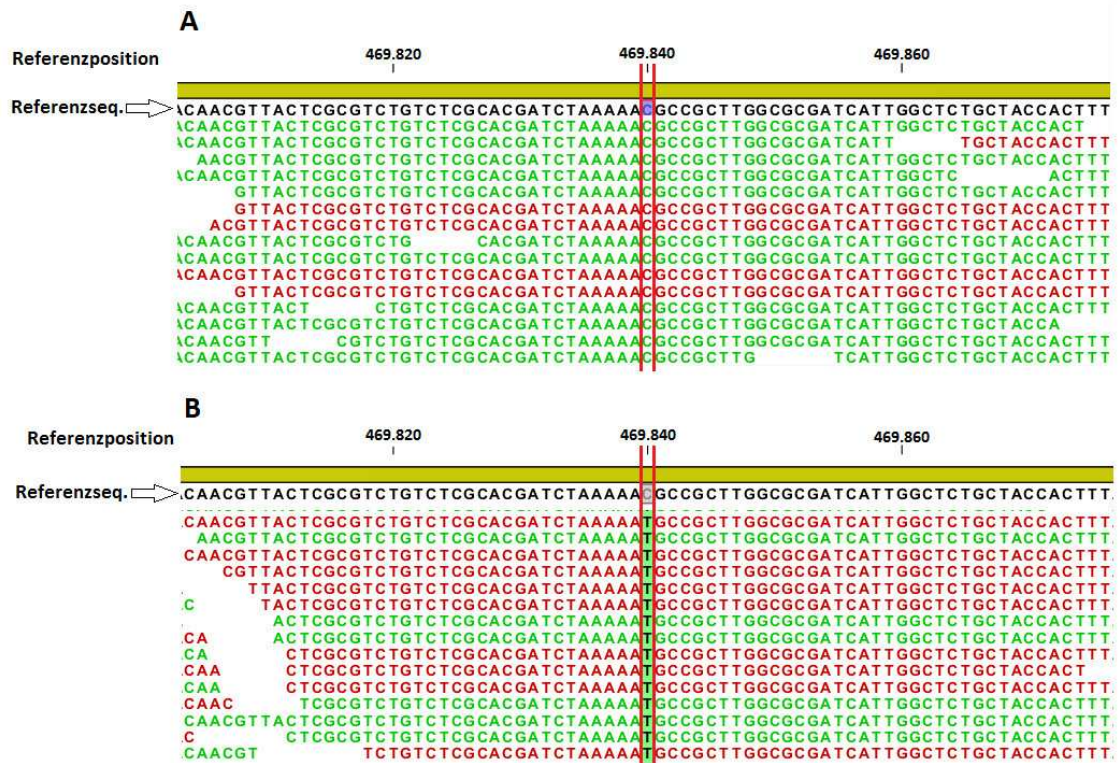


Abbildung 17: Sequenzvergleich des Wt Genoms und Genom pools an der Referenzposition 460.840.

Dargestellt ist die Annotation zu einem Abschnitt des Gens VC_A0531. Die Referenzsequenz ist dargestellt in schwarz, rot und grün sind die annotierten Fragmente der Sequenzierung. Senkrechte rote Balken markieren das betreffende Allel. (A) Wt Genom zeigt keine Veränderung, (B) im Genompool ist ein SNP von C zu T zu sehen.

Auf den ersten Blick zeigt Abbildung 17 (B) eine 100 %ige Abdeckung durch die Base T, hierbei handelt es sich nur um einen Ausschnitt der Annotation. Aufgrund der hohen Abdeckung von 621 (siehe Tabelle 24) konnte nicht das gesamte Ergebnis in einer Abbildung erfasst werden. Der Austausch der ursprünglichen Base C zu T wurde in etwa 30 % aller Sequenzen detektiert. In Tabelle 25 sind die Veränderungen der Codons und der hieraus resultierenden AS in der Proteinsequenz aufgeführt.

Tabelle 25: AS-Austausch durch SNPs im Gen VC_A0531.

	Ref.pos.	Ref. Allel	Mut. Allel	Codon alt	Codon neu	Pos. AS	AS alt	AS neu
1	469.840	C	T	ACG	AUG	283	Thr	Met
2	469.210	T	C	CUA	CCA	73	Leu	Pro
3	470.014	C	A	CCU	CAU	341	Pro	His
4	470.169	G	A	GAA	AAA	393	Glu	Lys
5	470.170	A	G	GAA	GGA	393	Glu	Gly

Alle 5 Punktmutationen im VC_A0531 Gen führen zu einer Änderung der AS in der Proteinabfolge. Bei der Recherche in der frei zugänglichen Datenbank „Pfam“ (*Protein Families*) konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Threonin zu Methionin auf Position 283 der Histidinkinase A (pfam00512), sich in der Dimerisations- und Phosphoakzeptor Domäne befindet, was in Abbildung 18 (A) zu sehen ist. Gewöhnlich grenzt diese Domäne an die C-terminale ATPase Domäne und kommt in einer Vielzahl von Bakterien und einigen Archaeen vor. Der Austausch der Glutaminsäure in Position 393 befindet sich in der HATPase_c Domäne (pfam02518), einer evolutionär konservierten Proteindomäne (siehe Abbildung 18 B). Diese Domäne ist Bestandteil verschiedener ATP-Bindeproteine, z. B. der Histidinkinasen, der DNA-Gyrase B, Topoisomerasen, des Hitzeshockproteins HSP90, Phytochrom-ähnlicher ATPasen und DNA-Mismatch-Reparaturproteine. Die AS-Austausche 2 und 3 aus Tabelle 25 befanden sich laut der Datenbank in keiner wichtigen Domäne von VC_A0531. Da der AS-Austausch der Position 283 am prägnantesten war, wird der Fokus hierauf gelegt.

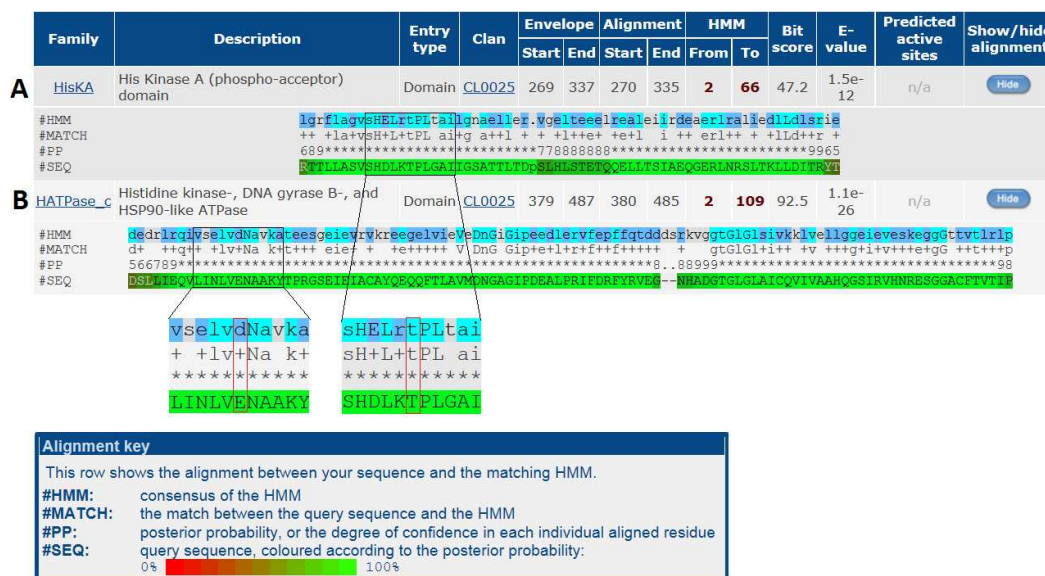


Abbildung 18: Abgleich der VC_A0531 AS-Sequenz mit bekannten Protein Domänen in der Datenbank „Pfam“.

Das Gen VC_A0531 kodiert für die osmosensitive K⁺-Kanal Sensor-Histidinkinase und besteht aus 497 Aminosäuren (siehe Anhang 6.3). Das homologe Protein in *E. coli* ist das membrangebundene KdpD, bestehend aus 894 Aminosäuren. Die Aufrechterhaltung des Turgordrucks ist fundamental für die regulatorischen Prozesse von Mikroorganismen. Wenn im Bakterium ein osmotischer Unterdruck entsteht, der zum Verlust des Turgordrucks führt, besteht die erste Antwort in der Aufnahme von K⁺-Ionen (112). Im Fall von *E. coli* werden diverse K⁺-Transportsysteme aktiviert. Unter physiologischen Bedingungen wird die K⁺-Aufnahme durch die TrkG-, TrkH- und Kup-Systeme gesteuert (113). Im Fall eines osmotischen Unterdrucks unter K⁺-limitierenden

Verhältnissen ($[K^+] < 2 \text{ mM}$), wird die Expression des hoch affinen K^+ -Transportsystems KdpFABC induziert. Die Expression des *kdpFABC* Operons befindet sich unter der Kontrolle der regulatorischen Proteine KdpD und KdpE, einer Histidinkinase und einem Reaktionsregulator, die zu einem Zweikomponenten-Sensor-Effektor System gehören (114). Die Signalübertragung beim Zweikomponentensystem erfolgt über den Transfer einer Phosphatgruppe vom ATP (Adenosintriphosphat) auf spezifische Histidinreste der Histidinkinase, dabei handelt es sich um eine Autophosphorylierung. Die Histidinkinase katalysiert ihrerseits den Transfer der Phosphatgruppen und überträgt diese auf Asparaginsäurereste des Reaktionsregulators. Die Phosphorylierung des Reaktionsregulators führt zu dessen Konformationsänderung, was gewöhnlich die Aktivierung einer Output Domäne verursacht und hierdurch die Expression bestimmter Gene stimuliert oder reprimiert. Abbildung 19 zeigt die Lage der Strukturdomänen in der Histidinkinase KdpD von *E. coli*.



Abbildung 19: Schema der Domänenstrukturen von KdpD in *E. coli*. Quelle: modifiziert nach Heermann et al., 2009 (115).

KdpD enthält die konservierte Domänen der Histidinkinasen *HATPase_c* (Histidinkinase-ähnliche ATPasen, Histidinkinase-, DNA-Gyrase B-, Phytochrome-ähnliche ATPasen) und der *HisKA* (Histidinkinase A, Phosphoakzeptor Domäne, Dimerisation und Phosphoakzeptor Domäne der Histidinkinase). Der N-terminale Teil enthält die konservierte *KdpD* Domäne und die *Usp* Domäne.

KdpD setzt sich zusammen aus vier mittig angeordneten transmembranen und zwei cytoplasmatischen Domänen. Die N-terminal angeordnete Usp Domäne dient der Interaktion mit dem universellen Stressprotein UspC, das als Gerüstprotein der KdpD/KdpE Signalkaskade fungiert (115). Die Mutation an Position 283 befindet sich in der C-terminal gelegenen HisKA Domäne. Abbildung 20 zeigt eine weitere Unterteilung der HisKA in Sequenzregionen, die in einem Großteil von Bakterien konserviert vorliegen.

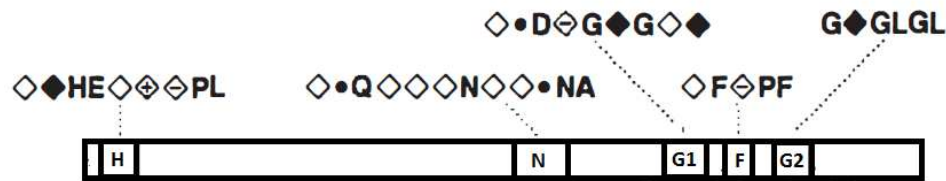


Abbildung 20: Fünf charakteristische Regionen „H“, „N“, „G1“, „F“ und „G2“ der HisKA Domäne. Quelle: modifiziert nach Parkinson et al., 1992 (116).

Buchstaben, die für AS stehen sind konserviert in 70 % der abgeglichenen Sequenzen. Rautensymbol steht für die Positionen, an denen 50 % der AS zu der gleichen chemischen Familie gehören: weiß, unpolar (I, L, M, V); schwarz, polar (A, G, P, S, T); Plus-Symbol, basisch (H, K, R); Minus-Symbol, azidisch oder amidisch (D, E, N, Q). Schwarze Punkte stehen als Platzhalter an Positionen mit weniger als 50 % der AS-Familienzugehörigkeit.

Die H-Region stellt die meist variable der insgesamt fünf Regionen dar, befindet sich am N-Terminus der Sequenz und enthält das Histidin, dessen Rest phosphoryliert wird und somit an der Autophosphorylierung beteiligt ist. Die übrigen Regionen sind C-terminal lokalisiert. Die Regionen G1 und G2 sind Glycin-reiche Bereiche der Nukleotidbinde Domäne (hier ATP). Beide Regionen werden getrennt durch eine Abstandregion variabler Länge und Sequenz, in dessen Mitte sich die F-Region befindet. Ein Fehlen der konservierten Regionen „H“, „N“, „G1“, „F“ oder „G2“ ist möglich (116). Ein Abgleich dieser Regionen mit dem Gen VC_A0531 ist in Abbildung 21 dargestellt.

H-Region
 LGVIYFLRY**PHERFAS**PEALRRESKIAPWVRSLLTSLARAHARTLAHVEAEKQLESTRITLLASVSHD
 LK**T**PLGAIIGSATTLTDPSLHLSTETQQELLTSIAEQGERLNRSLTKLLDITRYTASALVPKLDWVEPEE
 N-Region
 LIGTVLSRLAPRLTHHKVQIESQPMVELDSL**IEQVLINLVEN**AKYTTPRGSEIEIACAYQEQQFTLA**V**
 G1-Region F-Region G2-Region
MDNGAGIPDEALPR**IFDRF**YRVEGNHAD**GTGLGL**AICQVIVAHHQGSIRVHNRESGGACFTVTIPCRQYN

Abbildung 21: Konservierte Regionen „H“, „N“, „G1“, „F“ und „G2“ im Gen VC_A0531.

Dargestellt ist die Original-AS-Sequenz des Bereichs, der die konservierten Regionen trägt. Grün-markiert sind die konservierten ASn, die rot-markierte AS ist das betroffenen Threonin, das zu Methionin mutiert ist.

Alle fünf Regionen sind vertreten im Gen VC_A0531, wobei die Sequenzen nicht 100 %ig übereinstimmen. Die mutierte AS Threonin auf Position 283 des Gens befindet sich zwischen der H- und der N-Region der Phosphoakzeptor Domäne von HisKA und liegt in keinem der konservierten Bereiche. Inwiefern diese Mutation ausschlaggebend ist bei der Resistenzentwicklung und bei dem Wirkmechanismus von vz0825, muss noch geklärt werden.

Anhand dieser ersten Ergebnisse könnte man annehmen, dass die Substanz vz0825 einen Effekt auf die Turgordruckregulation in der bakteriellen Zelle ausübt, indem die Signalweiterleitung des Zweikomponentensystems gestört wird. Die Mutationen im Gen VC_A0531, das eine Sensor-Histidinkinase kodiert, wäre ein Hinweis für einen gezielten Selektionsdruck, der eine Funktionsänderung dieser Histidinkinase herbeiführt. Für weitere Aussagen sind weitere Analysen notwendig.

3.2. Cholera-toxin-Assay (CT-Assay)

Traditionelle Antibiotika töten Bakterien (bakterizide Wirkung) oder inhibieren das Wachstum (bakteriostatische Wirkung) und agieren in dem sie Funktionen wie Zellwandsynthese, DNA-Replikation, RNA-Transkription oder Proteinsynthese stören. Aufgrund der gravierenden Wirkung der Antibiotika auf die bakterielle Zelle, üben sie einen selektiven Druck aus und fördern das Entstehen der Antibiotika-resistenten Stämme (117). Ein neuer Ansatz besteht darin Substanzen zu finden, die nicht das Wachstum bzw. die Viabilität direkt beeinflussen, sondern einen Effekt auf die Virulenz der pathogenen Bakterien haben und somit einen geringeren selektiven Druck ausüben. Man spricht in diesem Zusammenhang bei den Wirkstoffen von „Pathoblockern“. Ein weiterer positiver Effekt der selektiven Adressierung von Pathogenitätsfaktoren besteht in einer Schonung der physiologischen bakteriellen Flora und dadurch der Verminderung von unerwünschten Nebenwirkungen von Antibiotika, wie z. B. der Entstehung von Diarrhö. Zu den Faktoren der Virulenz gehören u. a. Toxine, Zytolysine, Proteasen, Mechanismen zur Beschädigung des Wirt-Gewebes (117), aber auch Adhäsionsfaktoren und die Fähigkeit Biofilme zu bilden. Die Nachfrage nach QS- oder Virulenz-reduzierenden Wirkstoffen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen steigt immer mehr (118). Auch wenn bereits nachgewiesen werden konnte, dass sich in *P. aeruginosa* relativ schnell eine Resistenz gegen den QS-Blocker C-30 entwickelt hat (119), besteht dennoch die Hoffnung, spezifische Pathoblocker als Wirkstoffe für die klinische Anwendung zu entwickeln. In *V. cholerae* stellen das CT und TCP, deren Expression u. a. über die QS-Signalkaskade reguliert wird (siehe 1.1.4), die wichtigsten Pathogenitätsfaktoren dar. CT ist der entscheidende Faktor, der die Durchfallerkrankung Cholera hervorruft. In dem hier vorgestellten CT-Assay wurde nach Substanzen gesucht, die die Expression dieses Pathogenitätsfaktors verringern.

3.2.1. Entwicklung und Etablierung des CT-Assays

Wahl des *V. cholerae* Stammes

Für diesen Teil der Arbeit benötigten wir einen Reporterstamm für ein schnelles und zuverlässiges Screening. Der Stamm MO10 pAKSB stammt vom parentalen Stamm MO10 des O139 Serotyps (siehe Seite 49) und wurde vom indischen Projektpartner zur Verfügung gestellt. Der Vektor pAKSB trägt ein Kanamycinresistenzgen unter der Regulation des *aphA*-Promoters. Um die Funktionalität des Reporterstamms zu verstehen, wurde der Zusammenhang zwischen dem QS-Signalweg, der Fähigkeit zur Kommunikation der Bakterien, und der Virulenzgenexpression bereits in Kapitel 1.1.4 erläutert. Im Mittelpunkt steht hier das *luxO/hapR* Regulon, das zur Regulation der *aphA*-Expression beiträgt. Die Expression des Transkriptionsfaktors AphA hat zur

Folge, dass am Ende einer Signaltransduktionskaskade die Virulenzgene exprimiert werden. Im Fall des Reporterstamms ist die Expression der Virulenzgene mit der Expression des Kanamycinresistenzgens gekoppelt, und die Bakterien können im Kanamycin-haltigen Selektionsmedium wachsen. Die CT-Produktion entspricht damit der Resistenz gegen Kanamycin. Eine Sensitivität gegen Kanamycin ist beim Reporterstamm MO10 pAKSB prinzipiell auch ohne Einfluss auf die CT-Bildung möglich. Wird der Reporterstamm unter Bedingungen inkubiert, die für die CT-Expression ungünstig sind, z. B. bei 30 °C (120), exprimiert der Stamm kein CT und ist demnach auch sensitiv gegen Kanamycin. Eine Wachstumsreduktion könnte in diesem Fall auch mit einer Interaktion der Substanzen mit der direkten Virulenzgen-Regulation zusammenhängen ohne, dass das QS beeinflusst wird (57, 121). Allgemein toxische Effekte, z. B. auf die Membranstruktur, die Genexpression generell, wichtige Stoffwechselprozesse etc. können ebenso zu einer Reduktion des Wachstums führen.

CT-Assay im Mikrotiterplatten-Format

Beim CT-Screening wurde mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB im Selektionsmedium mit Kanamycin gearbeitet. Das Standardmedium für die CT-Expressionsversuche war AKI. Dieses Medium bewirkt aufgrund seiner Zusammensetzung eine erhöhte CT-Expression bei *V. cholerae* El Tor Stämmen des O1 Serotyps (120). Auch wenn MO10 dem O139 Serotyp angehörte, war die CT-Expression für die Durchführung des Screening ausreichend. Durchgeführt wurde das Screening in 96- bzw. 384-Well-MTPn. Für die Bestimmung des Wachstums wurde die OD₆₀₀ gemessen. Um die Qualität des Assays zu verifizieren, wurde der Z'-Faktor nach der Formel in Abbildung 11 errechnet. Die Kontrollen und ihre Anordnung auf den 96- und 384-Well-MTPn entsprachen denen des Wachstumsassays und sind in Abbildung 10 dargestellt. Als Positivkontrolle für die Wachstumsinhibition wurde Ciprofloxacin eingesetzt. Eine spezifischere Positivkontrolle, die nur die Virulenzgenexpression reduziert, war nicht verfügbar. Der errechnete Z'-Faktor lag zwischen 1 und 0,5 und damit in einem ausreichend hohen Bereich für ein Screening mit zuverlässigen Ergebnissen.

3.2.2. Screening verschiedener Substanzsammlungen im CT-Assay

Etwa 20.000 Substanzen wurden im CT-Screening eingesetzt, wobei die CDI Sammlung nur teilweise getestet wurde. Alle eingesetzten Substanzsammlungen wurden in Kapitel 3.1.2 bereits beschrieben. In Abbildung 22 ist das relative Wachstum unter Einfluss der getesteten Substanzen dargestellt. Diejenigen Substanzen, die das Wachstum um mindestens 50 % reduzierten, wurden als Hits des initialen Screenings definiert.

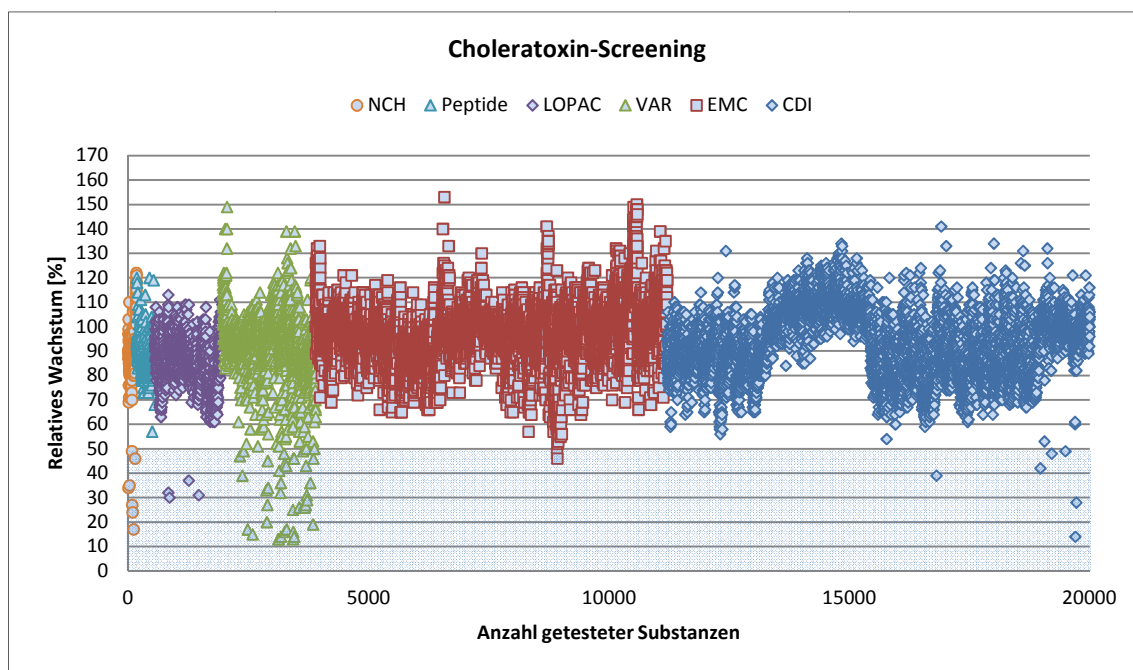


Abbildung 22: Relatives Wachstum des Reporterstamms MO10 pAKSB.

Markierungen im blauen Bereich entsprechen Substanzen, die beim initialen Screening eine Reduktion des Wachstums um mindestens 50 % bewirkten.

Tabelle 26 fasst die Hits der einzelnen Substanzsammlungen zusammen. Unter den 56 Substanzen, die in diesem Screening aufgefallen waren, befanden sich 41 Substanzen, die auch im Screening mit dem GFP-exprimierenden *V. cholerae* Stamm eine Reduktion des Wachstums verursachten (siehe Kapitel 3.1.2). Diese Substanzen hatten somit einen Effekt auf das bakterielle Wachstum und nicht spezifisch auf die Virulenzgenexpression. 15 neue aktive Substanzen wurden identifiziert, für die ein Einfluss auf die Expression des Kanamycinresistenzgens und CTs vermutet werden konnte.

Tabelle 26: Zusammenfassung der MO10 pAKSB Wachstum reduzierenden Substanzen.

Sammlung	Anzahl Substanzen \leq 50 % Wachstum					Σ
	50-40 %	40-30 %	30-20 %	20-10 %	10-0 %	
NCH	2	2	2	1	0	7
Peptide	0	0	0	0	0	0
LOPAC	0	4	0	0	0	4
VAR	13	7	7	10	0	37
EMC	2	0	0	0	0	2
CDI	3	1	1	1	0	6
						56

3.2.3. Aktive Substanzen im CT-Assay

Um auszuschließen, dass die neu identifizierten Substanzen aus Tabelle 26 das bakterielle Wachstum beeinflussen, wurden sie zunächst in einem zweiten Durchlauf im AKI-Medium ohne Kanamycin untersucht. Substanzen, die in Antibiotika-freiem Medium keinen Effekt auf das Wachstum hatten, gehörten zu den potentiellen Hits für den CT-Assay. Nach dem zweiten Durchlauf blieben sechs aktive Substanzen, deren Bezeichnungen und Strukturformeln in Abbildung 23 dargestellt sind.

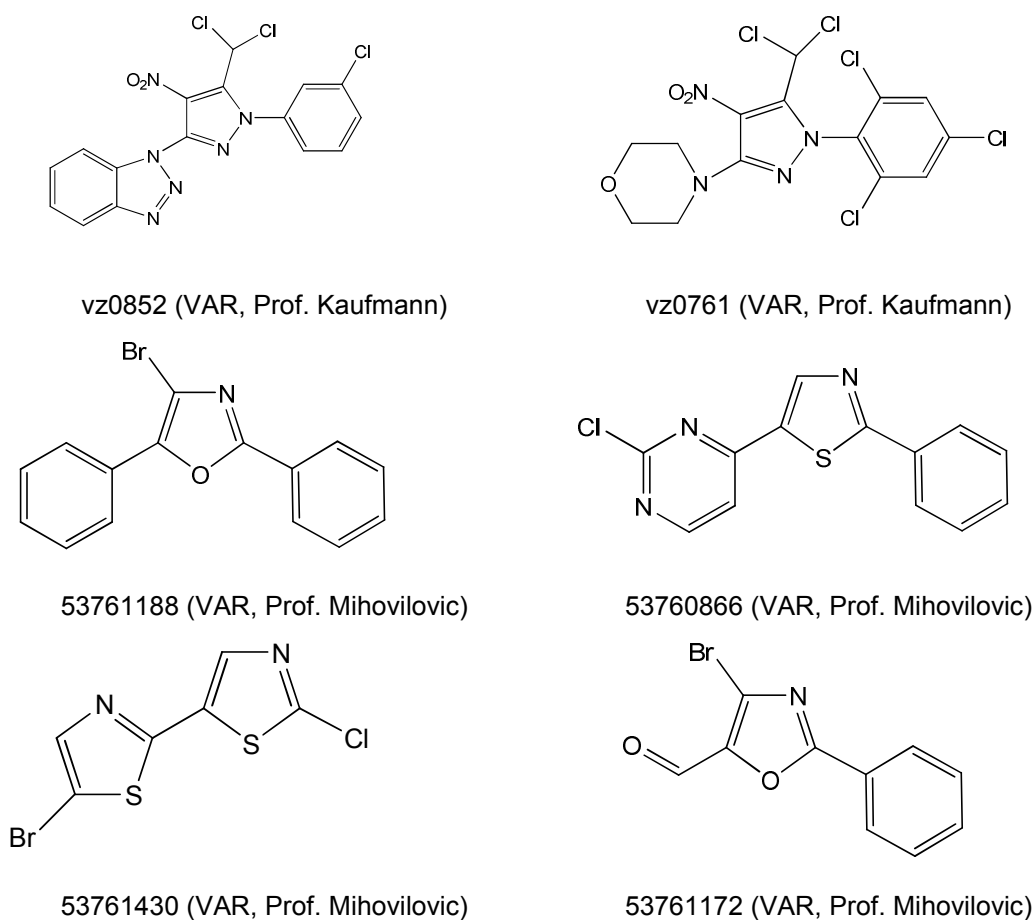


Abbildung 23: Codes, Hersteller und Strukturformeln der aktiven Substanzen im CT-Screening.

Auch diese sechs Substanzen wurden durch MALDI, ESI-Massenspektrometrie und /oder NMR-Messungen auf ihre Identität untersucht. Die erhaltenen Daten stimmten in allen Fällen mit den Erwartungen überein. Die gemessenen Aktivitäten wurden demnach von den Originalstrukturen hervorgerufen. In der Datenbank „SciFinder“ wurde eine Suche nach strukturverwandten Substanzen durchgeführt. Mit vz0852 verwandte Strukturen gehören zu den Klassen der Fungizide (122), Herbizide (123), Na-Kanal Blocker (124) oder sogenannten „Lebensspanne-verändernden Verbindungen“ (125). Mit vz0761 verwandte Strukturen gehören zu den Klassen der Herbizide (126), Pestizide (127), Fungizide (128), Inhibitoren von Histon-Deacetylasen

(129) oder „Lebensspanne-verändernden Verbindungen“ (125). Strukturen verwandt mit 53761188 gehören zu den Gruppen der Herbizide (130) oder ATP-Kinase-Inhibitoren (131). Unter den mit 53760866 strukturverwandten Substanzen fanden sich Entzündungshemmer (132), Kinase Inhibitoren (133-136), Fungizide (137) oder Herbizide (138). Zu den Hydrolase-Inhibitoren (139), Inhibitoren von Histon-Acetylasen (140), oder Antagonisten zu AI-2 bei *Vibrio harveyi* (141), gehören strukturverwandte Verbindungen von 53761172. Strukturverwandte Verbindungen mit 53761430 werden eingesetzt als antivirale Agentien (142) oder Pestizide (143). Alle sechs Verbindungen wurden bis zu dem Zeitpunkt der Recherche noch nicht im Zusammenhang mit antimikrobiellen Wirkungen erwähnt.

3.2.4. Bestimmung der IC₅₀-Werte

Für die weitere Evaluierung der sechs aktiven Substanzen wurden mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB die mittleren inhibitorischen Konzentrationen bestimmt, bei denen das Wachstum um 50 % reduziert wurde (IC₅₀-Wert). Ermittelt wurden die Wachstumsraten im AKI-Medium mit und ohne Kanamycin unter Einfluss verschiedener Konzentrationen der Wirkstoffe. Abbildung 24 zeigt exemplarisch die relativen Wachstumsraten in beiden Medien bei steigenden Konzentrationen von Substanz vz0852.

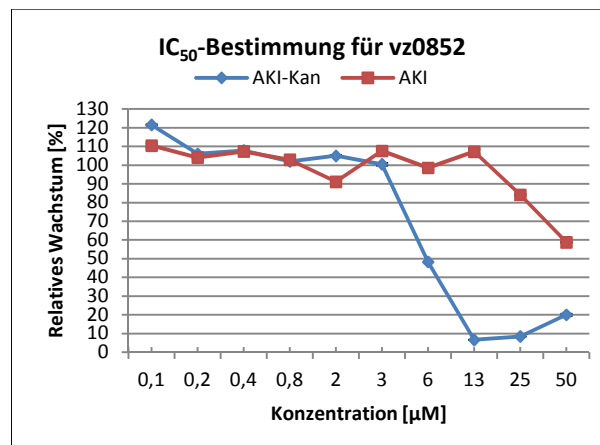


Abbildung 24: IC₅₀-Bestimmung für vz0852 mit MO10 pAKSB.

Die Reduktion des Wachstums setzt im AKI-Kan-Medium bei der Konzentration > 3 μM ein und hat bei 13 μM den tiefsten Punkt erreicht. Im AKI-Medium ist hingegen erst bei einer Konzentration von > 13 μM eine leichte Reduktion zu beobachten. Bei einer Konzentration von 50 μM wurde hier das Wachstum um etwa 40 % reduziert. Diese Untersuchung wurde für alle sechs Hits durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: IC₅₀-Werte der aktiven Substanzen aus dem CT-Screening, ermittelt nach 24-stündiger Inkubation von Stamm MO10 pAKSB.

Substanz	IC ₅₀ -Wert [µM]	
	AKI-Kan-Med.	AKI-Med.
vz0852	6	> 50
vz0761	10	> 100
53761188	14	38
53760866	38	>> 100
53761430	75	>> 100
53761172	100	>> 100

Das Wachstum des Reporterstamms im AKI-Medium war in den meisten Fällen nicht beeinträchtigt. Neben der Substanz vz0852, hatte 53761188 hier einen Wachstum reduzierenden Effekt. Der Grund für die leichte Wachstumsreduktion von vz0852 und 53761188 bei höheren Konzentrationen könnte neben einer Beeinflussung der CT-Expression, in einer Interferenz mit weiteren bakteriellen Stoffwechselwegen oder Strukturen liegen.

3.2.5. Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Test

Die Substanzen aus Abbildung 23 wurden auf ihre zytotoxische Wirkung auf L929-Zellen untersucht. Nach einem Inkubationszeitraum von 24 h konnten Aussagen über die akute Toxizität einer Substanz gemacht werden. Um darüber hinaus eine Aussage über mögliche proliferationsinhibierende Eigenschaften und längerfristige Toxizitäten zu erheben, wurden die Wirkstoffe über fünf Tage mit den Zellen inkubiert. Die folgende Graphik zeigt exemplarisch die Toxizität von Substanz vz0852 bei verschiedenen Konzentrationen.

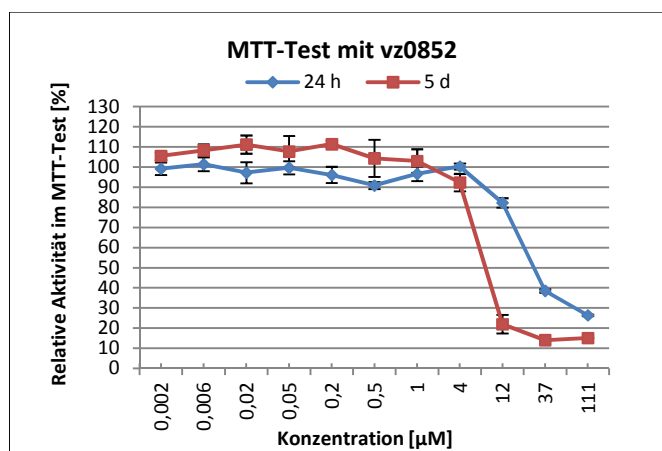


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Zytotoxizität von vz0852 im MTT-Test mit L929-Zellen.

Bereits nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit vz0852 fand bei der Konzentration $> 4 \mu\text{M}$ eine Vitalitätsreduktion der Zellen statt. Nach 5-tägiger Inkubation der Zellen sank der IC_{50} -Wert nur um den Faktor 3, was ein Hinweis darauf ist, dass vz0852 einen relativ schnellen Effekt auf die Zellen zeigt. Die Testung aller aktiven Substanzen ergab die in Tabelle 28 aufgelisteten IC_{50} -Werte. Neben den sechs aktiven Substanzen wurde hier auch die Zytotoxizität von Virstatin bestimmt. Virstatin ist ein bereits bekanntes Molekül, das die Expression der Virulenzgene des klassischen Stamms O395 reduziert indem es die Dimerisierung des Aktivators ToxT verhindert (50, 144). Die Verbindung wurde in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle eingesetzt. Einige *V. cholerae* Stämme der non-O1 / non-O139 Serotypen, die sporadisch zu der Cholera-Erkrankung führen, haben hingegen Mechanismen, die sie gegen Virstatin resistent machen (145).

Tabelle 28: IC_{50} -Werte des MTT-Tests ermittelt in L929-Zellen.

Substanz	IC_{50} -Wert [μM]	
	24 h	5 d
vz0852	30	10
vz0761	62	21
53761188	74	25
53760866	> 111	111
53761430	$>> 111$	> 111
53761172	> 185	> 185
Virstatin	$>> 111$	$>> 111$

Die Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 zeigten neben den guten Aktivitäten im CT-Freisetzungstest gleichzeitig relativ hohe Toxizitätswerte im MTT-Test. Überschneidungen der IC_{50} -Werte des MTT-Tests nach 24-stündiger Inkubation aus Tabelle 27 und den IC_{50} -Werten der Wirkstoffaktivitäten in bakteriellen Zellen aus Tabelle 28 waren nicht vorhanden. Die IC_{50} -Werte der drei aktivsten Substanzen des CT-Assays und des MTT-Tests unterschieden sich im Faktor 5 bis 6. Auch hier besteht prinzipiell die Möglichkeit, die Strukturen mit den Methoden der Medizinischen Chemie dahingehen zu modifizieren, dass die Aktivität der Substanzen zunimmt und die Toxizität sich verringert.

3.2.6. Weitere Evaluierung der drei aktivsten Substanzen des CT-Assays

Die weiteren Evaluierungen wurden mit den aktivsten Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 durchgeführt. Für die Experimente wurden, wie auch im Wachstum-screening, zwei pathogene *V. cholerae* Wt Stämme des El Tor Biotyps eingesetzt. Da

sich jeder Stamm etwas anders verhält, wurde zunächst überprüft, ob die Substanzen einen Effekt auf das bakterielle Wachstum haben. Bereits bei den Untersuchungen mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB war gefunden worden, dass höhere Konzentrationen von vz0852 eine Wachstumsreduktion bewirkten (siehe Abbildung 24). Die beiden Wildtypstämme zeigten eine unterschiedliche Beeinflussung durch die Wirkstoffe.

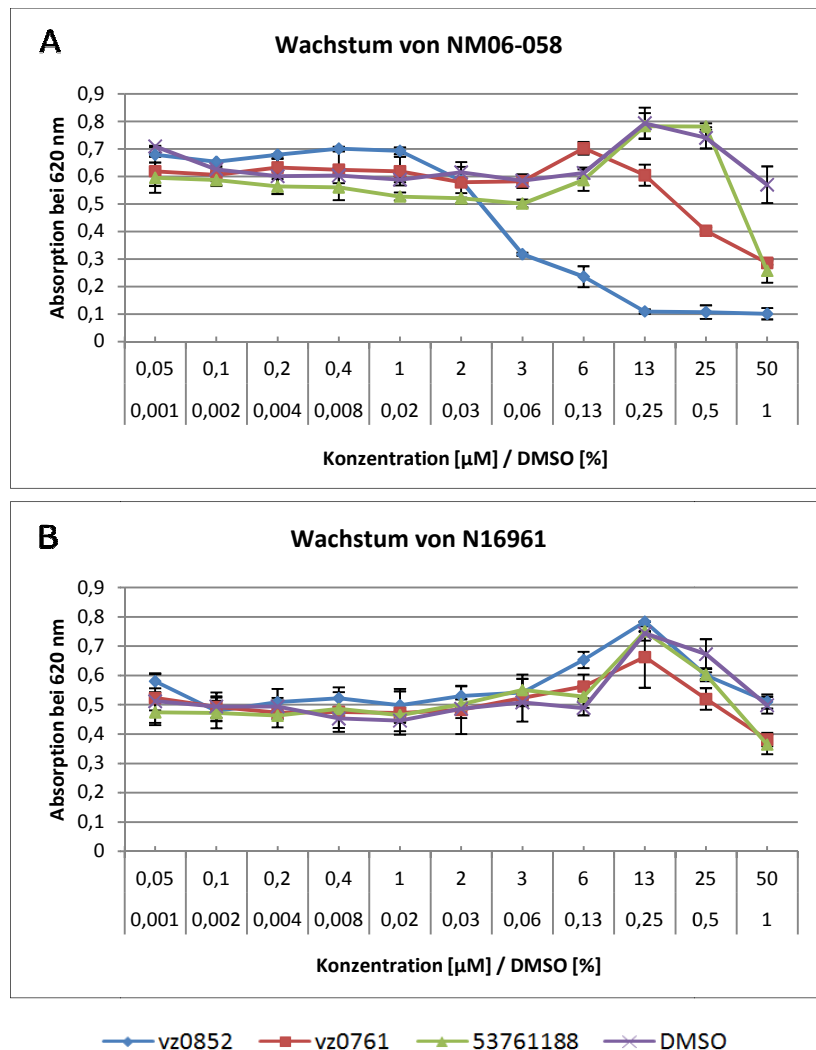


Abbildung 26: Effekt der Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 auf das Wachstum von NM06-058 und N16961.

In Abbildung 26 (A) ist zu sehen, dass alle drei Substanzen in NM06-058 bei höherer Konzentration einen antibakteriellen Effekt aufwiesen. Die Substanz vz0852 zeigte erst bei einer Konzentration von $< 3 \mu\text{M}$ keinen messbaren antibakteriellen Effekt auf Stamm NM06-058. Die Substanzen vz0761 und 53761188 zeigten erst bei < 25 bzw. $< 50 \mu\text{M}$ entsprechende Effekte. In Abbildung 26 (B) ist zu sehen, dass bei dem Stamm N16961 bei allen eingesetzten Konzentrationen nahezu kein antibakterieller Effekt

auftritt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich eine stammspezifisch unterschiedlich ausgeprägte wachstumsreduzierende Wirkung der Substanzen.

G_{M1}-ELISA zum Nachweis des Cholera-toxins im Überstand der Kultur

Die mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB erhaltenen Ergebnisse zeigten in Anwesenheit der Wirkstoffe eine selektive Reduktion des Wachstums im AKI-Kan-Medium. Es war zu erwarten, dass parallel mit dieser Wachstumsreduktion eine Verminderung der CT-Expression vorlag. Mit einer vom Wachstumsassay unabhängigen Methode wurde die Freisetzung von CT im Medium direkt überprüft und quantifiziert. Dazu wurde der immunologisch basierte G_{M1}-ELISA für den direkten Nachweis von sekretiertem CT im Medium einer *V. cholerae* Kultur verwendet.

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren zur Detektion von Proteinen, Viren, Antikörpern, Hormonen oder Toxinen. In diesem Fall sollte das CT detektiert und quantifiziert werden, das von den Bakterien sekretiert wird und sich im Kulturmedium anreichert. Dieses Toxin wurde mit dem G_{M1}-ELISA quantifiziert, einer speziellen, in der Literatur beschriebenen Variante des ELISA-Verfahrens (146). Die Besonderheit dieser Variante ist das Beschichten der Mikrotiterplatten mit dem Molekül Monosialogangliosid (G_{M1}). Ganglioside sind Sphingolipide, die über ihren Lipidanteil in der äußeren Zellmembran verankert sind. G_{M1} fungiert als natürlicher Rezeptor für das CT und das *E. coli* Hitze-labile Enterotoxin an den Darmepithelzellen (43). Diese Rezeptorfunktion macht man sich im G_{M1}-ELISA zu Nutze für die Detektion des sekretierten CTs. Zur Kontrolle der Funktionalität des G_{M1}-ELISAs wurden nach der Beschichtung der 96-Well-MTP mit G_{M1} verschiedene Konzentrationen des CTs in die Wells der MTP gegeben, inkubiert und anschließend mit dem primären Anti-CT-AK aus Kaninchen und dem sekundären HRP konjugierten Anti-Kaninchen-AK aus Ziege markiert. Als Substrat der HRP wurde das OPD eingesetzt, für die Detektion der Reaktion wurde die Absorption bei 485 nm gemessen. Je mehr CT an die G_{M1}-Moleküle gebunden hatte, desto höher war das Signal. In Abbildung 27 ist die Abhängigkeit des Signals von steigender CT-Konzentration zu sehen. Anhand dieser Standardkurve wurde die CT-Konzentration in den zu untersuchenden Proben ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

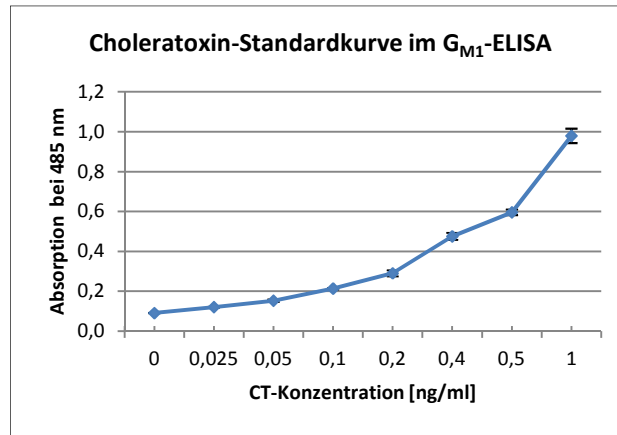


Abbildung 27: CT-Standardkurve erstellt mit handelsüblichem CT.

Untersucht wurde die CT-Sekretion der Stämme NM06-058 und N16961 unter Einfluss der Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 bei verschiedenen Konzentrationen. Abbildung 28 zeigt die durchschnittlich ermittelte relative CT-Konzentration im Vergleich zu der Negativkontrolle mit DMSO für 5 Konzentrationen von vz0852. Dafür wurden die Kulturen im AKI-Medium für 16 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Iwanaga beschrieb in seiner Arbeit (120) die Verwendung des AKI-Mediums für die erhöhte CT-Produktion durch *V. cholerae* O1 Biotyp El Tor. Dazu wurden die Kulturen stationär für 20 h bei 37 °C inkubiert. Da in den hier beschriebenen Versuchen die Inkubation im Schüttler erfolgte, wurde die Zeit auf 16 h reduziert. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass die produzierte Menge CT auch nach 16-stündiger Inkubation für die Analyse der Wirkstoffe ausreichend war.

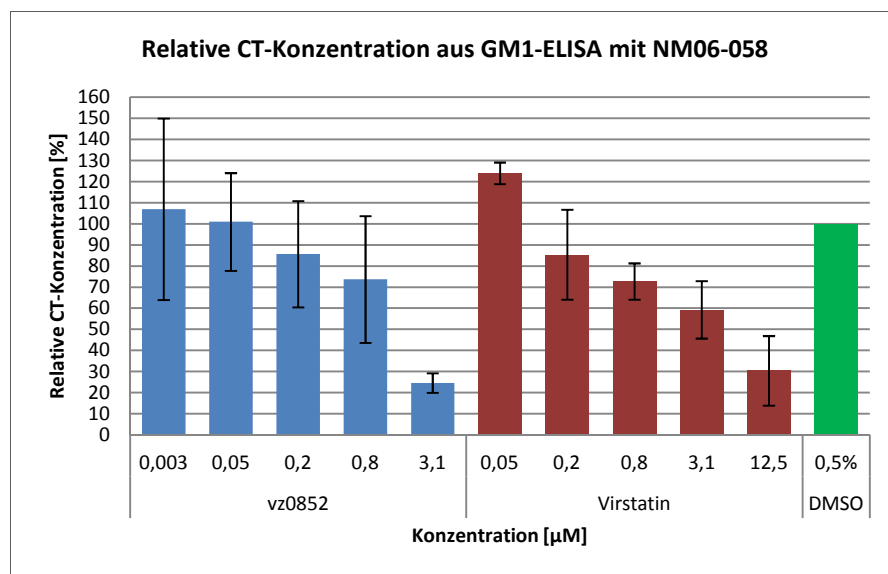


Abbildung 28: Relative CT-Konzentration im Überstand von NM06-058 Kulturen.

Untersuchung verschiedener Konzentrationen der Substanz vz0852. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten Virstatin und DMSO.

Durchschnittlich produzierte der Stamm NM06-058 in einem Kulturvolumen von 2 ml und 1×10^9 CFU/ml unter Zugabe von 0,5 % DMSO etwa 100 ng/ml CT. Mit steigender Konzentration beider Substanzen verringerte sich die relative CT-Konzentration im Überstand der Kulturen. Dabei wurde die Konzentration immer auf den Wert der Negativkontrolle bezogen, der 100 % der CT-Konzentration entsprach. Der IC_{50} -Wert für vz0852 lag zwischen 3,1 und 0,8 μ M, und von Virstatin zwischen 12,5 und 3,1 μ M. Die aus den graphischen Auftragungen gemittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: IC_{50} -Werte für vz0852, vz0761, 53761188 und Virstatin, detektiert mittels G_{M1} -ELISA.

Substanz	IC_{50} -Wert [μ M]	
	NM06-058	N16961
vz0852	1,9	7,8
vz0761	6,8	15,1
53761188	6,4	25
Virstatin	4,3	12,5

Innerhalb beider Stämme unterscheiden sich die Werte für eine Substanz in einem Faktor von 2-4. Alle drei Substanzen sind aktiver bei dem Stamm NM06-058. Im Vergleich der Ergebnisse aus Tabelle 27, die mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB ermittelt wurden, und der IC_{50} -Werte des G_{M1} -ELISAs, wurden die Aktivitäten bestätigt. Somit konnte gezeigt werden, dass in den drei Stämmen MO10 pAKSB (O139 Serotyp), N16961 und NM06-058 (O1 Serotyp, El Tor Biotyp) unter Einfluss der drei identifizierten Wirkstoffe eine Reduktion der CT-Sekretion stattgefunden hat.

Quantifizierung von Cholera toxin in Zelllysaten von NM06-058

Um die Veränderung der CT-Konzentration unter Einfluss der aktiven Substanzen innerhalb und außerhalb der bakteriellen Zelle zu erfassen, wurden parallel zum G_{M1} -ELISA, durchgeführt mit dem Überstand der Kulturen, auch die Zelllysate der behandelten Kulturen mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot auf die CT-Konzentration analysiert. Das beim Western Blot auf die Membran transferierte CT konnte mittels des primären Kaninchen-Anti-CT und des sekundären HRP konjugierten Ziege-Anti-Kaninchen AKs detektiert werden. Um die Intensität der Banden untereinander vergleichen zu können, wurde das Housekeeping-Protein RecA mittels eines spezifischen AKs gegen das RecA von *E. coli* detektiert. Der Nachweis mit dem Kaninchen-Anti-RecA AK war möglich aufgrund der Sequenz-Similaritäten von RecA in *E. coli* und *V. cholerae* (147). Das RecA aus *E. coli* hat eine Größe von etwa 38 kDa (147) und das von *V. cholerae* 39 kDa (148).

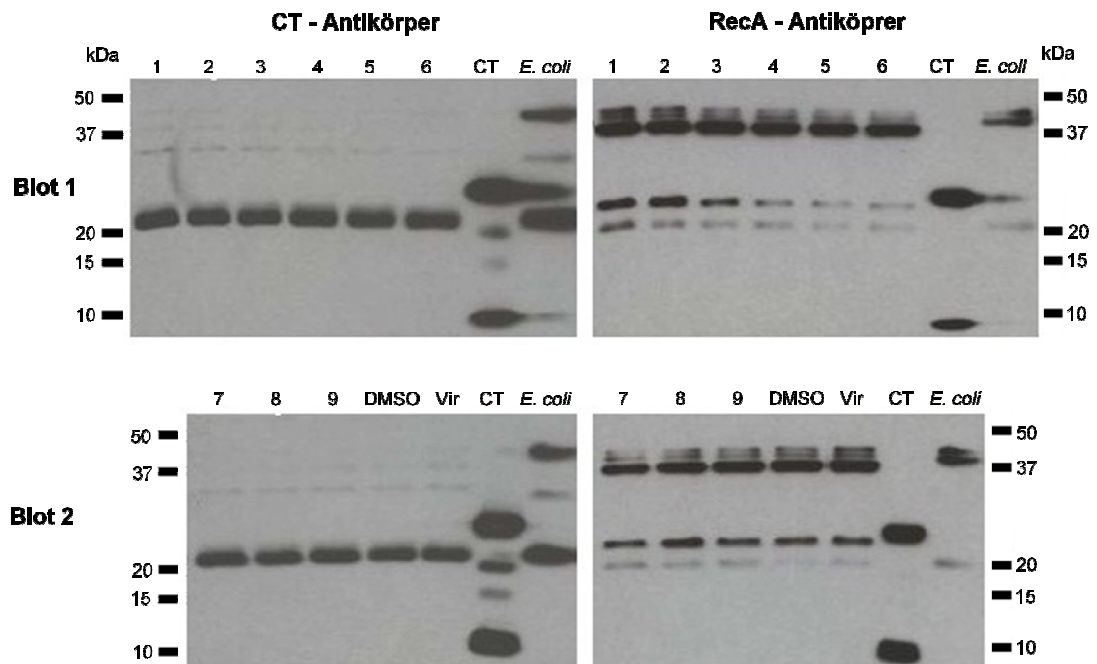


Abbildung 29: Western Blots der bakteriellen Lysate von NM06-058.

*Detektion von CT und RecA: 1-3 entspricht den Konzentrationen 25 μ M, 12,5 μ M, 6,3 μ M von 53761188, 4-6 entspricht den Konzentrationen 12,5 μ M, 6,3 μ M, 3,1 μ M von vz0761, 7-9 entspricht den Konzentrationen 3,1 μ M, 1,6 μ M und 0,8 μ M von vz0852. 0,5 % DMSO entspricht der Negativkontrolle, die Positivkontrollen ist 100 μ M Virstatin. 0,5 μ g CT und das *E. coli* BL21(DE3) Lysat sind Kontrollen der Antikörperspezifität.*

In Abbildung 29 sind zwei Blots dargestellt, die zuerst mit dem CT-Antikörper und anschließend mit dem RecA-Antikörper behandelt wurden. Zum einen ist zu sehen, dass der CT-Antikörper unspezifisch an Proteine aus dem *E. coli* Lysat gebunden hatte. Anhand der Bindung an das kommerzielle CT konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis trotzdem möglich war. Die Größe des CTs aus *V. cholerae* und *E. coli* Lysaten, sowie des kommerziellen CTs war nicht identisch. Das Protein aus dem *V. cholerae* Lysat wurde bei ca. 20 kDa detektiert, das kommerzielle CT hatte zwei starke Banden bei ca. 25 und 10 kDa und zwei schwächere bei ca. 18 und 15 kDa. Das *E. coli* Lysat wies ebenfalls drei Banden auf, u. a. bei 20 kDa, was einer unspezifischen Bindung des AKs zuzuschreiben war. Der wahrscheinliche Grund der unterschiedlichen CT-Größe aus *V. cholerae* und dem handelsüblichen CTs ist, dass das CT in der Zelle als Präprotein vorliegt und z. B. Sekretionssignalsequenzen trägt. Das RecA hatte die erwartete Größe von 39 kDa. Das *E. coli* Lysat diente als Kontrolle für den RecA-Antikörper. Sowohl das CT, als auch das RecA aus *V. cholerae* und *E. coli* wurden erfolgreich nachgewiesen. Mit dem Programm „ImageJ“ wurden nach dem Einscannen der Blots die Pixelintensitäten der Banden ermittelt und graphisch dargestellt. Als Referenz wurde für diese Auswertung das RecA-Signal verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 zu sehen.

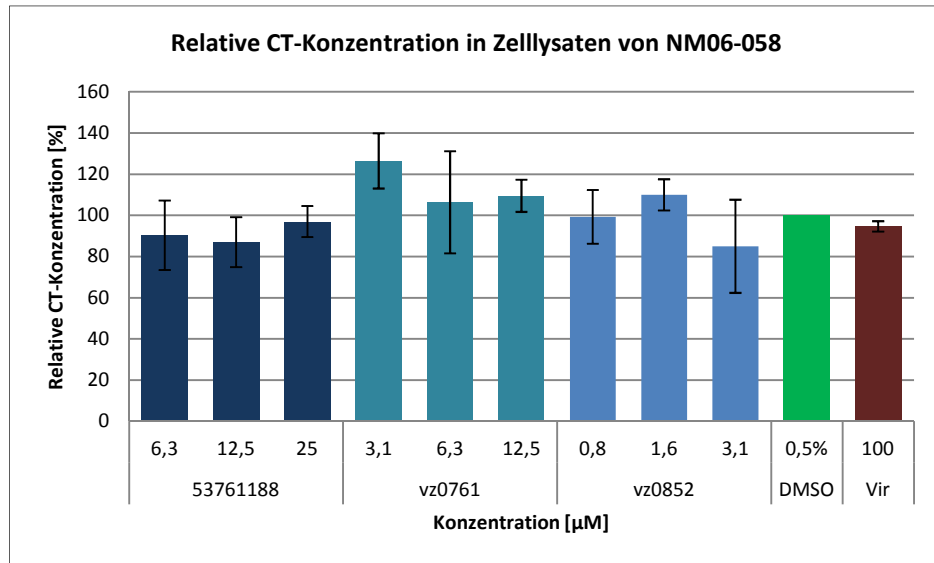


Abbildung 30: CT-Konzentration in Zelllysaten von NM06-058.

Eine Reduktion des sekretierten CTs im Medium, wie in Abbildung 24 und Abbildung 28 gezeigt wurde, konnte zwei Ursachen haben. Zum einen wäre es möglich, dass die bakteriellen Zellen unter Einfluss der Substanzen weniger CT exprimieren und somit auch weniger CT nach außen sekretiert werden konnte. Zum anderen konnten die Sekretionsmechanismen der Zelle durch die Substanzen gestört worden sein, so dass das CT aus den bakteriellen Zellen nicht sekretiert werden konnte und sich intrazellulär oder in der Zellmembran / Zellwand anreicherte. Im ersten Fall wäre eine Verminderung des CTs, und im zweiten Fall eine Erhöhung des CTs im Zelllysate zu erwarten. Die Western Blot Analysen zeigten allerdings keine signifikanten Veränderungen bei allen drei getesteten Konzentrationen, wie in Abbildung 30 dargestellt ist. Die 100 µmolare Virstatin-Konzentration zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die intrazelluläre CT-Konzentration, obwohl für diese Substanz eine verminderte CT-Sekretion nachgewiesen wurde (144). Eine verringerte CT-Konzentration in der Zelle konnte anhand dieser Messung nicht gezeigt werden. Auch eine Zunahme der CT-Konzentration in der bakteriellen Zelle war nicht nachweisbar, so dass die Ergebnisse keine Hinweise auf einen Wirkmechanismus der Substanzen ergaben.

Analyse des Transkriptionslevels des Gens *aphA* und der Virulenzgene *ctxA* und *tcpA* durch quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Um Hinweise auf die Funktionsweise der Wirkstoffe zu erhalten, wurde analysiert, ob sie einen Effekt auf die Transkription der für die Bildung von CT und TCP zuständigen Gene *ctxA* und *tcpA* hatten. Außerdem wurde untersucht ob das mRNA-Level von *aphA*, dem Masterregulator der ToxR-Virulenzkaskade, unter Einfluss der aktiven Substanzen ebenfalls reduziert wurde. Die aktiven Substanzen führten in den Vorversuchen zu einer Sensitivität gegen Kanamycin und hierdurch zu einer

Wachstumsreduktion des Reporterstamms MO10 pAKSB. Da sich im Stamm MO10 pAKSB das Kanamycinresistenzgen unter der Kontrolle des *aphA*-Promotors befand, war die Schlussfolgerung, dass die Expression von *aphA* durch die aktiven Substanzen reduziert werden musste. Da AphA bei der Regulation der Virulenzgenexpression beteiligt ist, müsste auch die Expression der Virulenzgene *ctxA* und *tcpA* reduziert werden. Für diesen Zweck wurden Kulturen von NM06-058 mit den Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 12 h lang inkubiert, die RNA wurde isoliert, eine RT-PCR durchgeführt und die cDNA in einer qRT-PCR eingesetzt. Als Kontrollgen diente auch in diesem Fall das Housekeeping-Gen *recA*, dessen Messwerte bei der Auswertung mit der LightCycler® 480 Software automatisch mit einbezogen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 zu sehen.

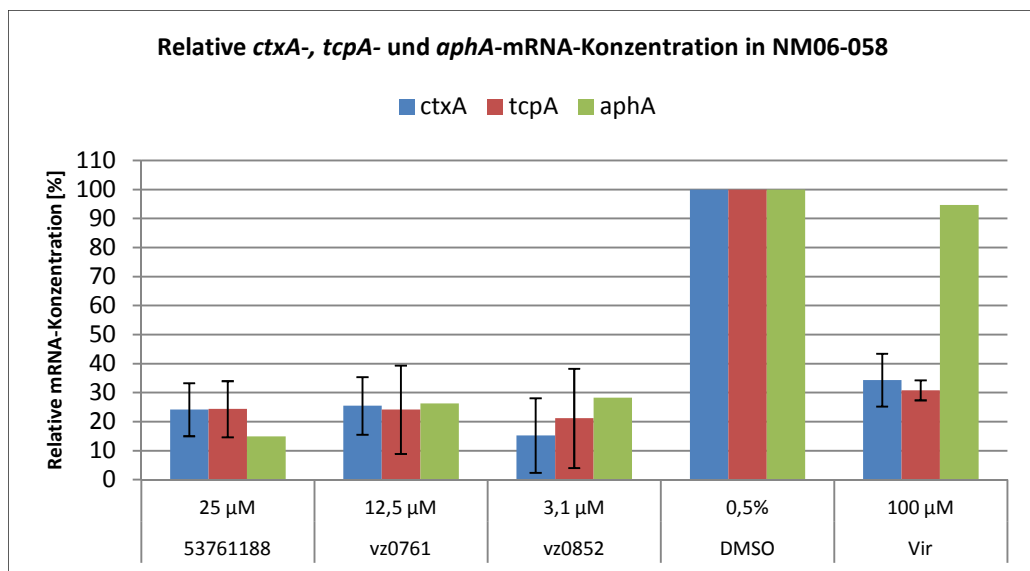


Abbildung 31: Messung der relativen mRNA-Konzentration von *aphA* und der Virulenzgene *ctxA*, *tcpA* unter Einfluss der aktiven Substanzen.

Durchgeführt wurde dieser Versuch in Doppelbestimmung in zwei separaten Durchläufen. Die Untersuchung von *aphA* wurde nur einmal durchgeführt und wird in folgenden Experimenten wiederholt. Die resultierenden Standardabweichungen beider Messungen sind relativ hoch, was dazu führt, dass die Aussagekraft der Ergebnisse skeptisch betrachtet werden sollte. Trotz der hohen Schwankungen innerhalb der Versuche, hatte sich bei beiden Durchführungen der qRT-PCR gezeigt, dass sich das mRNA-Level aller untersuchten Gene durch die Substanzen reduzieren ließ. Virstatin, diente hier als Positivkontrolle für *ctxA* und *tcpA*, jedoch als Negativkontrolle für *aphA*, da es ausschließlich einen Effekt auf die Expression der Virulenzgene hat (50).

Die Isolierung und Aufarbeitung der mRNA aus bakteriellen Zellen, sowie die Durchführung der qRT-PCR sind sehr aufwändige Methoden, die zur Bestimmung des

mRNA-Levels von einer begrenzten Anzahl der Gene parallel angewandt werden können. Da das Target der aktiven Substanzen bisher noch unbekannt ist und evtl. die Expression einer Vielzahl von Genen untersucht werden muss, ist die Transkriptomanalyse mittels Mikrochips eine effizientere Methode. Mit dieser Methode lassen sich die mRNA-Level aller in der Zelle transkribierten Gene gleichzeitig untersuchen und vergleichen.

3.2.7. Transkriptomanalysen durchgeführt am NICED, Kalkutta

Die im Folgenden beschriebene Analysen und Methoden wurden am NICED vom Projektpartner durchgeführt. Dabei wurde die Substanz 53760866 eingesetzt, die zu den sechs identifizierten Hits des CT-Assays gehörte, in unseren Experimenten jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Suppression der TCP-Expression

In Kalkutta durchgeführte Experimente mit dem klassischen Stamm O395 und dem El Tor Stamm N16961 des O1 Serotyps und der aktiven Substanz 53760866 zeigten eine Reduktion der TCP-Expression durch beide Stämme. Kulturen, die im AKI-Medium mit 25 µmolarer Konzentration des Wirkstoffs 53760866 inkubiert wurden, zeigten eine komplette Verhinderung der TCP-Expression an der Zelloberfläche der Bakterien.

Transkriptomanalysen

Transkriptomanalysen unter Anwendung der Microarray-Technologie stellen ein wertvolles Werkzeug zur parallelen Erhebung des Expressionsprofils zahlreicher Gene dar. Ein typischer DNA-Microarray enthält tausende Oligonukleotide, die das Genom des zu untersuchenden Organismus repräsentieren. Diese sind auf einem Trägermaterial (z. B. Glas) an definierten Positionen immobilisiert. Zur Charakterisierung des Genexpressionsprofils wird mRNA aus dem zu untersuchenden Organismus (bzw. aus den Zellen oder Geweben) extrahiert und in cDNA revers transkribiert. Zur Detektion der cDNA wird diese markiert, wozu meist Fluoreszenzfarbstoffe, z. B. die Cyanin-Farbstoffe Cy3 und Cy5 dienen. Die markierte cDNA wird mit den Sonden auf dem Array hybridisiert. Nach Entfernung nicht-gebundener cDNA wird die Signalintensität der hybridisierten cDNA für jede Sonde ermittelt. Die Signalintensität ist proportional zur Menge exprimierter mRNA, so dass über den Vergleich der Signale von cDNA unterschiedlicher Herkunft Aussagen über relative Unterschiede in der Genexpression getroffen werden können.

Untersucht wurde das Transkriptom vom *V. cholerae* El Tor Stamm N16961 unter Einfluss von 25 µmolarer Konzentration der Substanz 53760866. Dazu wurde der Stamm mit und ohne Zusatz des Wirkstoffs inkubiert, die gesamte RNA der Bakterien wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in dieser Form in eine Microarray basierte

komparative Transkriptomanalyse eingesetzt. Die ersten Ergebnisse zeigten u. a. eine verminderte Expression von *edd* (kodierend für die Phosphogluconat-Dehydratase) und *eda* (kodierend für die Keto-Hydroxyglutarat-Aldolase / Keto-Deoxy-Phosphogluconat-Aldolase), die beide zum Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg), dem Abbau von D-Glucose zu Pyruvat in Bakterien, gehören (149). Beide Enzyme gehören zu den Lyasen. Bei einer Störung des ED-Wegs katalysieren Bakterien die Bildung von Glucose über den Pentosephosphatweg (PP-Weg) (150). Ribulose-5-Phosphat, ein Zwischenprodukt des PP-Wegs, führt zu einer LuxS-unabhängigen AI-2 Bildung und stellt somit eine Verbindung zum QS-Signalweg her, der seinerseits auch für die Regulierung der Virulenzgenexpression verantwortlich ist. *In vitro* Analysen der indische Projektpartner vom Deletionsstamm Δedd N16961 zeigten eine verminderte CT-Expression im Vergleich zum Wt Stamm (Daten nicht angegeben). Neben der Abregulation von *edd* und *eda* zeigte die Substanz einen Effekt auf weitere Virulenzgene. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch weiter evaluiert und ausgewertet werden. Eindeutig konnte gezeigt werden, dass dieser Wirkstoff mehrere Effekte in der bakteriellen Zelle hervorruft und die Expression zahlreicher Gene, u. a. auch wichtige Virulenzgene, beeinflusst werden.

Weitere Transkriptomanalysen mit der Microarray-Technologie und der hier beschriebenen aktivsten Substanz vz0852 sind in Planung.

3.3. Protoporphyrinogen IX Oxidase-Aktivitätsassay (PPO-Aktivitätsassay)

3.3.1. Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO)

Das Häm ist ein eisenhaltiges Tetrapyrrol und Cofaktor des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin, das für den Transport von Sauerstoff verantwortlich ist (151). In Mikroorganismen erfüllen Häme eine Vielzahl von Funktionen, z. B. bilden sie eine prosthetische Gruppe der Cytochrome und sind notwendig für die Funktion der Elektronen-Transport-Kette im Metabolismus des molekularen Sauerstoffs, diatomarer Gase und in zahlreichen Redox-Reaktionen. Im aeroben Metabolismus dient Häm als prosthetische Gruppe in Cytochromen, Hämoglobinen, Katalasen und Peroxidasen (152). Exogenes Häm dient als Eisenlieferant in pathogenen Bakterien für die Kolonisierung eukaryotischer Zellen. Es hat unter anderem die Funktion eines regulatorischen Moleküls zur Modulierung der Genexpression auf dem transkriptionellen und translationellen Level (151). Der Syntheseweg des Häms ist in Abbildung 32 dargestellt.

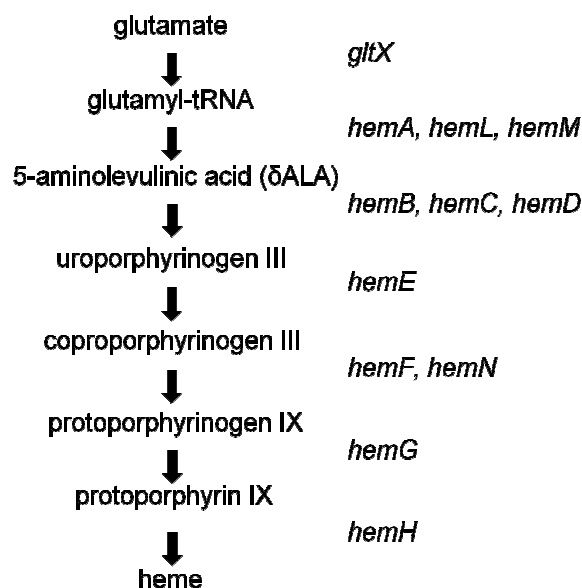


Abbildung 32: Häm-Biosyntheseweg (C5-Syntheseweg). Quelle: Nishimura et al, 1995 (153).

Dargestellt sind die Intermediate und Enzym-kodierenden Gene zur Katalyse der Reaktionen.

Das *hemG* Gen kodiert die PPO, die wiederum das vorletzte Enzym der Häm-Biosynthesekette ist und die Oxidation von Protoporphyrinogen IX (Proto'gen) zu Protoporphyrin IX (Proto) katalysiert. Zwei Arten der bakteriellen PPO sind bekannt, das in *E. coli* exprimierte Enzym, kodiert von *hemG* und das in *Bacillus subtilis*

exprimierte Enzym, das von *hemY* kodiert wird. Organismen, die ein PPO-kodierendes Gen tragen, besitzen vorwiegend das *hemY* Gen. Das bakterielle *hemY* Produkt ist ein Homolog zu der PPO in Eukaryoten. Das *hemG* Gen besitzen unter den Prokaryoten nur *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella multocoda*, *Mesorhizobium loti*, *Yersinia pestis* und *V. cholerae* (152). Welchen Einfluss die PPO auf das Wachstum der bakteriellen Zelle hat, ist in Abbildung 33 dargestellt.

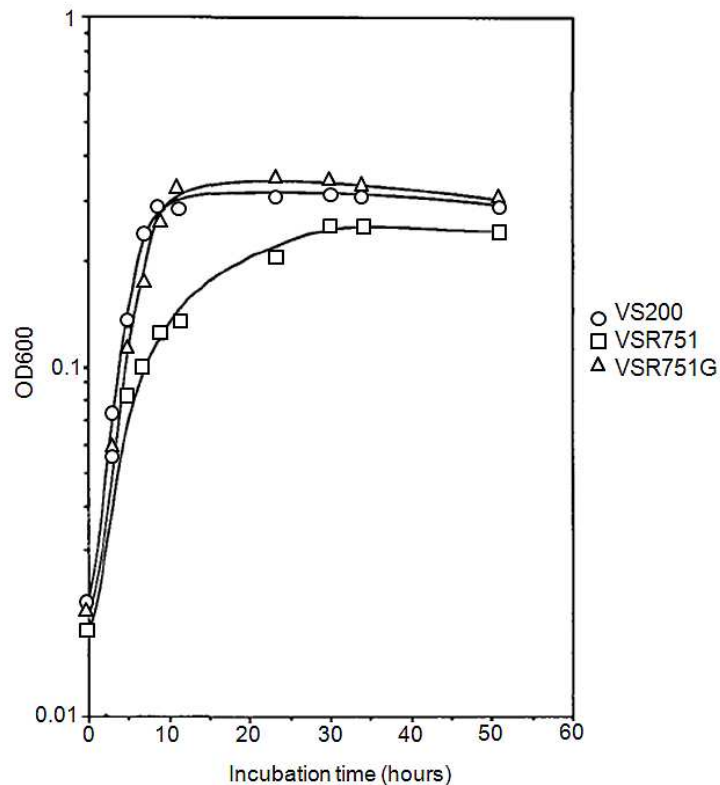


Abbildung 33: Wachstumskurven von *E. coli* K-12 *hemH*- und *hemG*-Mutanten. Quelle: Nishimura et al, 1995 (153).

Ü. N. Kulturen von einzelnen Kolonien wurden verdünnt bis zu einer $OD_{600} = 0,02$ und bei 37 °C inkubiert. VS200 ($\Delta hemH$), VSR751 ($\Delta hemH \Delta hemG$), VSR751G *hemG*-Komplementationsmutante.

Alle Mutanten wuchsen langsam wegen der Deletion des *hemH* Gens ($\Delta hemH$). Nach 12-14 h erreichte VS200 die stationäre Phase ($OD_{600}=0,35$), während VSR751 35 h benötigte ($OD_{600}=0,25$). VSR751G benötigte die gleiche Zeit wie der parentale Stamm VS200. Die *hemH*-Deletionsmutante VS200 ist nicht in der Lage Häm zu produzieren, weist ein langsames Wachstum auf und hat demnach eine geringere Vitalität. Das Wachstum der Doppelmutante VSR751 ($\Delta hemH \Delta hemG$) war langsamer als bei VS200. Nach einer Komplementation von *hemG* zeigte der Stamm VSR751G die gleiche Vitalität wie der Ursprungstamm VS200. Das spricht dafür, dass PPO als

Bestandteil des Häm-Biosynthesewegs ebenso ein für das Wachstum wichtiges Enzym ist. Einer der Gründe dieser verringerten Vitalität wird in Abbildung 34 dargestellt.

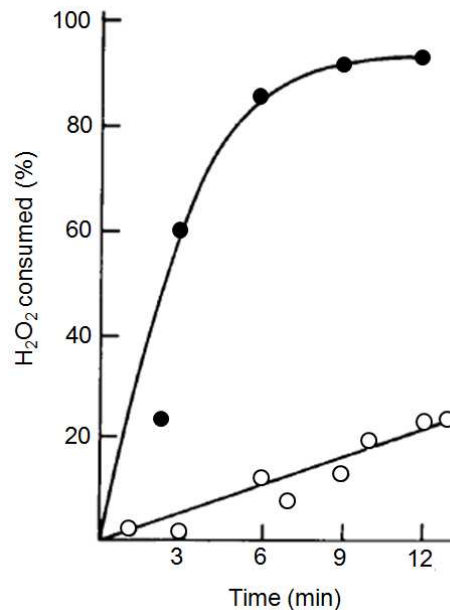


Abbildung 34: Katalase-Aktivität von *E. coli* K-12: ○, SASX38; ●, Hfr Cavalli. Quelle: Sasarman et al., 1979 (154).

SASX38 ist ein Häm-defizienter Stamm des *E. coli* K-12 Hfr Cavalli Stammes. Das Wachstum des SASX38 Stammes im normalen Medium ist langsam und er wächst auf Agarplatten in sehr kleine Kolonien. Nach mehreren Tagen Inkubation bildet der Stamm einen rot fluoreszierenden Farbstoff aufgrund der Akkumulation des Protoporphyrins IX. Extrakte des Häm-defizienten und Wt Stammes wurden auf Katalase-Aktivität getestet. Das Extrakt des Häm-defizienten Stammes weist einen geringeren H₂O₂-Umsatz zu O₂ und H₂O auf. Das bedeutet, dass die Katalase-Aktivität des Lysats dieses Stammes reduziert ist (154). H₂O₂ ist ein Zellgift, das sich in diesem Fall in den Zellen anreichert und das Wachstum durch Zellteilung vermindert. Die Beispiele in Abbildung 33 und Abbildung 34 beziehen sich auf Untersuchungen mit *E. coli*. Vergleichbare Untersuchungen mit *V. cholerae* wurden bisher noch nicht getätigt.

Die PPO ist ein essentielles Enzym, kommt in nahezu allen Organismen vor und ist Bestandteil des Chlorophyll- und des Häm-Biosynthesewegs. Alle Eukaryoten besitzen das Enzym in ihren Mitochondrien. Beim Menschen wird PPO in Herz, Hirn, Lunge, Plazenta, Leber, Skelettmuskeln, Nieren und Pankreas produziert. Mutationen in dem die PPO-kodierenden Gen *PPOX* können eine schwere Stoffwechselkrankheit verursachen, die Porphyria variegata, eine angeborene Bildungsstörung des roten Blutfarbstoffs Häm.

Sowohl in *E. coli* wie auch in *V. cholerae* wird die PPO von dem *hemG*-Gen kodiert. Ziel im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen war es zunächst die *hemG*-Sequenz aus *V. cholerae* zu amplifizieren, und diese in den *E. coli* Expressionstamm BL21(DE3) zu klonieren. Hier sollte die PPO exprimiert, isoliert und anschließend mit dem Enzym ein Screening durchgeführt werden. Gesucht wurde nach Substanzen, die im Enzym-Assay die Aktivität der PPO inhibieren und auf diese Weise in der Lage sein sollten, die Vitalität von *V. cholerae* zu reduzieren. Ob die Aktivitäten solcher Substanzen begrenzt auf die bakterielle PPO sind, oder unerwünschte Nebeneffekte der eukaryotischen PPO des Menschen hervorrufen, ist nicht auszuschließen und müsste untersucht werden. Herbizide wie Acifluorfen und Nitrofen inhibieren nicht nur die pflanzliche PPO. *In vitro* Enzym-Studien mit isolierten hepatischen Mitochondrien aus Ratten und Hühnerembryonen zeigten u. a. eine Inhibierung der PPO aus Säugern (155). Gleichzeitig inhibiert das Herbizid Acifluorfen nur schwach die bakterielle PPO (156). Wenn es Substanzen gibt, die auf die pflanzliche, also eukaryotische PPO einen stärkeren Effekt haben als auf die bakterielle PPO, dann wäre eine umgekehrte Aktivität ebenfalls denkbar. Bisher sind jedoch noch keine selektiven Hemmstoffe der bakteriellen PPO beschrieben.

3.3.2. Klonierung und Expression von HemG (PPO) aus *V. cholerae*

Wahl der *V. cholerae* und *E. coli* Stämme für die Klonierung

Die *hemG*-Sequenz für die Klonierungsarbeiten stammt aus dem pathogenen *V. cholerae* Stamm CM-2 (erhalten von Dr. Carsten Matz, HZI), ein Isolat gehörend zum El Tor Biotyp des O1 Serotyps. Gründe für diese Wahl waren die Pathogenität von CM-2, und die bei NCBI bereits veröffentlichte *hemG* Nukleotidsequenz des Stamms N16961 (siehe Anhang 6.3), der dem gleichen Serotyp und Biotyp entspricht. Die veröffentlichte *hemG* Sequenz wurde für das Entwerfen der Klonierungsprimer verwendet. Der Stamm N16961 wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls verwendet, da die Klonierungsarbeiten aber vor dem Erhalt von N16961 stattfanden, wurde mit dem oben genannten Stamm gearbeitet.

Die *E. coli* Klonierungs- und Expressionsstämme waren DH5 α und BL21(DE3). DH5 α wurde zur Vervielfältigung des Vektors mit der klonierten *hemG* Sequenz und BL21(DE3) für die Expression von HemG verwendet.

Klonierungsstrategie des *hemG*-Gens aus *V. cholerae* in *E. coli*

Der erste Schritt war eine Kolonie-PCR, wobei das *hemG* Gen aus dem Stamm CM-2, unter Verwendung von spezifisch konstruierten Primern (siehe Tabelle 11) mit entsprechenden Schnittstellen für spätere Klonierungsschritte, amplifiziert wurde. Die gleichen Schnittstellen waren auf dem Klonierungsvektor pET33b(+) lokalisiert, für die

später folgende Ligation. Die Amplifikation wurde mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt, um später zwei Konstrukte zu bekommen, bei denen der His-Tag am N-Terminus bzw. am C-Terminus des Proteins lokalisiert war. Die Amplifikate hatten jeweils eine Größe von 550-570 bp, was der Größe der resultierenden Banden in Abbildung 35 entsprach.

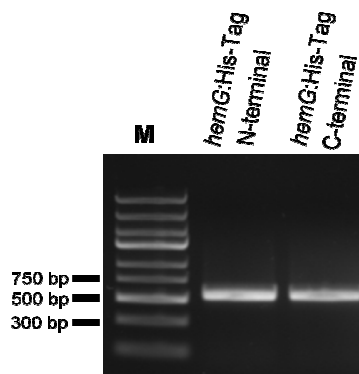


Abbildung 35: Agarosegel der Kolonie-PCR von Stamm CM-2.

Die Größe der amplifizierten hemG-Sequenz mit beiden Primerpaaren entspricht etwa 570 und 550 bp.

Im nächsten Schritt folgte die Restriktionsspaltung der Amplifikate und des Klonierungsvektors pET33b(+) (siehe Anhang 6.3) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen, anschließend wurden der Vektor und das dazu passende Amplifikat ligiert. Das Vektor-Insert-Konstrukt wurde in chemokompetente DH5α Zellen transformiert und auf LB-Kan-Agarplatten selektiert. Nach der ü. N. Inkubation der Selektionsplatten wurden diese ausgezählt. Etwa 1.000 Kolonien wurden auf der Platte mit den Transformanten gezählt, die das Konstrukt 1 mit dem His-Tag am N-Terminus trugen. 60 Kolonien waren es auf der Platte mit den Transformanten des Konstrukts 2 mit dem His-Tag am C-Terminus der Sequenz. Ein Wachstum auf den LB-Kan-Platten bedeutete eine erfolgreiche Transformation des Vektors, der ein Resistenzgen gegen das entsprechende Antibiotikum trug. Um sicher zu gehen, dass das erwünschte Insert sich wirklich in den Klonen befand, wurden jeweils 10 Kolonien gepickt und eine Kolonie-PCR mit dem Einsatz vom T7-Promoter-Primer und T7-Terminator-Primer durchgeführt. Das erwartete Produkt hatte die Größe von etwa 750 bp (siehe Abbildung 36).

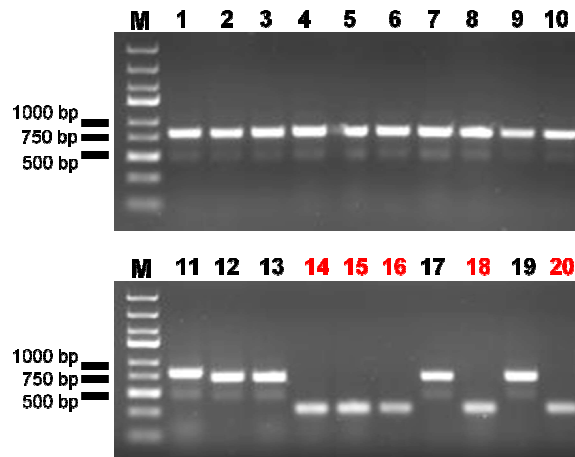


Abbildung 36: Agarosegele der Kolonie-PCR von DH5α pET33b(+):hemG.

1-10 stellt die Produkte der Kolonie-PCR der 10 Klone mit dem Konstrukt 1 dar. 11-20 sind Produkte der Kolonie-PCR von 10 Klonen mit dem Konstrukt 2. Von diesen 10 Klonen trugen 5 nicht das richtige Konstrukt mit der Größe von etwa 750 bp (rot markiert).

Um sicher zu gehen, dass die Nukleotidsequenz der Inserts keinen Fehler aufwies, wurden die Plasmide der Klone 1, 2, 11 und 12 isoliert und sequenziert (AG Genomanalyse, HZI). Die Sequenzierung ergab die Richtigkeit der Nukleotidsequenzen. Jeweils ein Klon mit Konstrukt 1 und Konstrukt 2 wurde für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Für den nächsten Schritt wurden die Plasmide beider Klone isoliert und gereinigt. Diese wurden jeweils in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Nach der Selektion wurde erneut mittels Kolonie-PCR das Vorhandensein des Inserts untersucht. In Abbildung 37 ist das Resultat der Kolonie-PCR zu sehen.

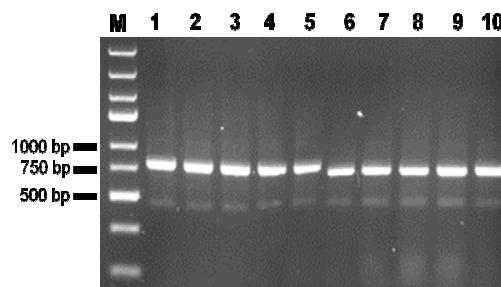


Abbildung 37: Agarosegel der Kolonie-PCR von BL21(DE3) pET33b(+):hemG.

1-5 sind Klone, die das Konstrukt 1 tragen, 6-10 sind Klone, die das Konstrukt 2 tragen. Das amplifizierte Produkt hat die Größe von etwa 750 bp.

Alle 10 Klone enthielten das gewünschte Produkt. Die Klone 1 und 6 mit Konstrukt 1 und Konstrukt 2 wurde für die Expressionsversuche genutzt.

Expression in BL21(DE3) und Aufreinigung der PPO

pET33b(+) ist ein Expressionsvektor, der das Lactose-Operon (*lac*-Operon) enthält. Nach der Klonierung der *hemG* Sequenz in den Vektor und der Transformation in BL21(DE3) war es möglich, die Expression des Enzyms PPO mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu induzieren. Dabei wirkt IPTG als Aktivator (Induktor) des *lac*-Operons, indem es an den Lac-Repressor (das Proteinprodukt des *lacI* Gens) bindet. Dadurch erfolgt eine allosterische Konformationsänderung des Repressors, die seine Wechselwirkung mit den *lac*-Operatoren inhibiert. Im Gegensatz zu Lactose bzw. Allolactose wird IPTG nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt, seine Konzentration ist deshalb während eines Versuchs konstant, und der Repressor bleibt inaktiviert.

Jeweils 100 ml des LB-Kan-Mediums wurde mit einem ml einer ü. N. Kultur der BL21(DE3) pET33b(+):*hemG* Stämme inokuliert, so dass eine Start OD₆₀₀ von etwa 0,05 vorlag. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht war. Induziert wurde durch Zugabe von 500 μ M IPTG, anschließend wurden die Kolben im Dunkeln für 5 weitere Stunden inkubiert. Jede Stunde wurde eine Probe entnommen, die OD₆₀₀ bestimmt und am Ende eine SDS-PAGE angefertigt, um den Anstieg der PPO-Expression zu überprüfen. In Abbildung 38 ist der Anstieg der PPO-Expression innerhalb der 5-stündigen Inkubation zu sehen.

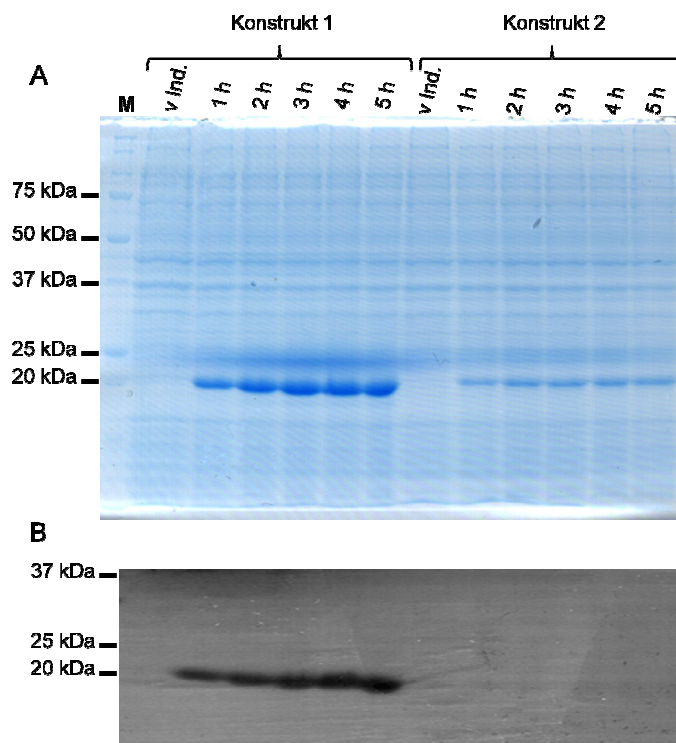


Abbildung 38: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Western Blot zum Nachweis der PPO-Expression. (Beschriftung siehe nächste Seite)

Konstrukt 1: His-Tag befindet sich am N-Terminus der PPO, Konstrukt 2: His-Tag befindet sich am C-Terminus der PPO. Proben: vor Induktion (v Ind.) und 1-5 h nach der Induktion. (A) Coomassie angefärbtes SDS-Gel. (B) Western Blot eines parallel hergestellten SDS-Gels. Detektion der PPO mittels Maus-Anti-His-Tag und Kaninchen-Anti-Maus-HRP konjugiertem Antikörpers.

Die PPO besteht aus 174 Aminosäuren, was einer Größe von etwa 21 kDa entspricht. In Abbildung 38 (A) ist eine deutliche Bande im entsprechenden Größenbereich zu sehen. Die Expression des Konstrukts 1 war wesentlich stärker ausgeprägt als die von Konstrukt 2. Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente nur noch mit Konstrukt 1 durchgeführt. Auch im Western Blot konnten, mit einem spezifischen Antikörper gegen den His-Tag, die entsprechenden Banden detektiert werden (siehe Abbildung 38 B). Auch hier war erkennbar, dass das Konstrukt 2 weitaus weniger stark exprimiert wurde.

Um einen PPO-Aktivitätsassay zu etablieren, wurden die BL21(DE3) Zellen lysiert und das Enzym über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Die Lyse erfolgte mit einem Hochdruckhomogenisator. Um die Bakterienzellen möglichst vollständig aufzuschließen, wurde das im Lysepuffer resuspendierte Pellet dreimal im Homogenisator behandelt. Trotz dieser aufwändigen Prozedur war das Enzym nicht komplett gelöst und lag zum großen Teil noch gebunden in den Zellfragmenten vor. Der im Lysat befindliche Teil des exprimierten PPO wurde weiter aufgereinigt (siehe Abbildung 39).

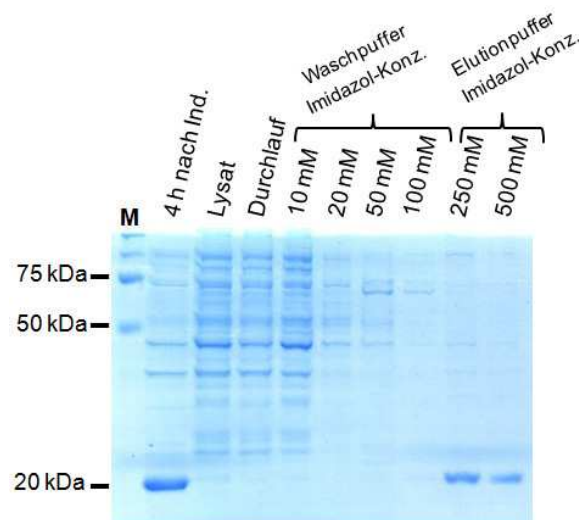


Abbildung 39: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Fraktionen vor und nach Aufreinigung des exprimierten PPO über eine Ni-NTA-Agarose-Säule.

Die steigende Imidazol-Konzentration machte die Aufreinigung des Enzyms effektiver, im Vergleich zu Experimenten (hier nicht gezeigt), in denen ein Waschpuffer mit nur einer 10 mmolaren Imidazol-Konzentration verwendet wurde. Die Elution erfolgte in

beiden Fällen mit je 3 ml Elutionspuffer. Anschließend wurde die PPO-Konzentration mit dem BCA-Test bestimmt. Um sicher zu gehen, dass während der Klonierung keine Leserasterverschiebung aufgetreten war, wurde das Enzym in der Abteilung Strukturbioogie des HZI durch Edman-Abbau vom N-Terminus aus ansequenziert (siehe Abbildung 40).

His-Tag (6 x H)										
Originalsequenz →	M	G	S	H	H	H	H	H	H	S
Sequenzierung →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S
	26	18	+3	8	15	18	19	21	18	+3
	M 19	V 6								
	A16	K 5								
	S 9	T 4								

14 AS vom Plasmid										
S	G	L	V	P	R	G	S	R	R	
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
S	G	L	V	P	R	G?	S?	R	R	
+2	+4	+4	<3	3	0.7		0.5	0.4	1.2	
					u.a.		G	N		
							0.4	0.5		

Ndel Schnittstelle					HemG-Sequenz →				
A	S	V	H	M	V	K			
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
A	S?	V	H?	M	V	K			
1.1		1			<0.3	0.1			
				K	M				
				0.6	0.5				

Abbildung 40: AS-Sequenz vom N-Terminus des exprimierten PPO.

Dargestellt ist die AS-Originalsequenz des Klonierungskonstrukts (grün) und das Resultat der ersten 27 detektierten AS (schwarz). Rot gekennzeichnet ist die falsche AS.

Die AS-Sequenz enthielt nur eine falsche AS, die sich am N-Terminus noch vor dem His-Tag befand und somit für weitere Experimente kein Problem darstellte.

3.3.3. Entwicklung und Etablierung des PPO-Aktivitätsassays

Herstellung des Substrats Protoporphyrinogen IX

Die PPO katalysiert den vorletzten Schritt der Häm-Biosynthese. Das Substrat der PPO ist Proto'gen, das zu Proto oxidiert wird (siehe Abbildung 41). Sechs Elektronen werden dabei auf das O₂ übertragen, das hier als Elektronenakzeptor fungiert. Dabei entsteht ein konjugiertes Doppelsystem von Tetrapyrrol-Makrozyklen (151).

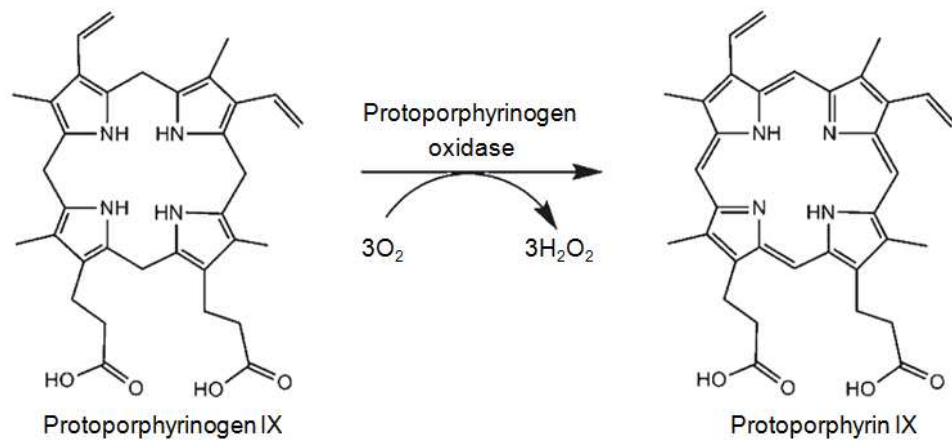


Abbildung 41: Reaktion katalysiert durch O₂-abhängige PPO. Quelle: Boynton *et al.*, 2009 (157).

Proto'gen, das Substrat der PPO, ist instabil und wird in Anwesenheit von Sauerstoff schnell zu Proto autoxydiert. Deshalb war es für die Etablierung des PPO-Aktivitätsassays erforderlich das Proto'gen zu synthetisieren und in einer stabilen Form bis zu seiner Verwendung zu lagern. Proto war handelsüblich erhältlich und Proto'gen wurde daraus in unserem Labor nach einem publizierten Protokoll hergestellt (94). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Palladium-katalysierte reduktive Hydrogenierung der Porphyrine (Protokoll siehe 2.2.5). Diese Reaktion musste unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt werden. Dafür wurden alle Kolben und Gefäße mit Argon ausgeblasen und die Lösungsmittel mit Argon gesättigt. Vor, während und nach der Reduktion wurden HPLC-Messungen durchgeführt, um den Verlauf der Reaktion zu überprüfen (siehe Abbildung 42).

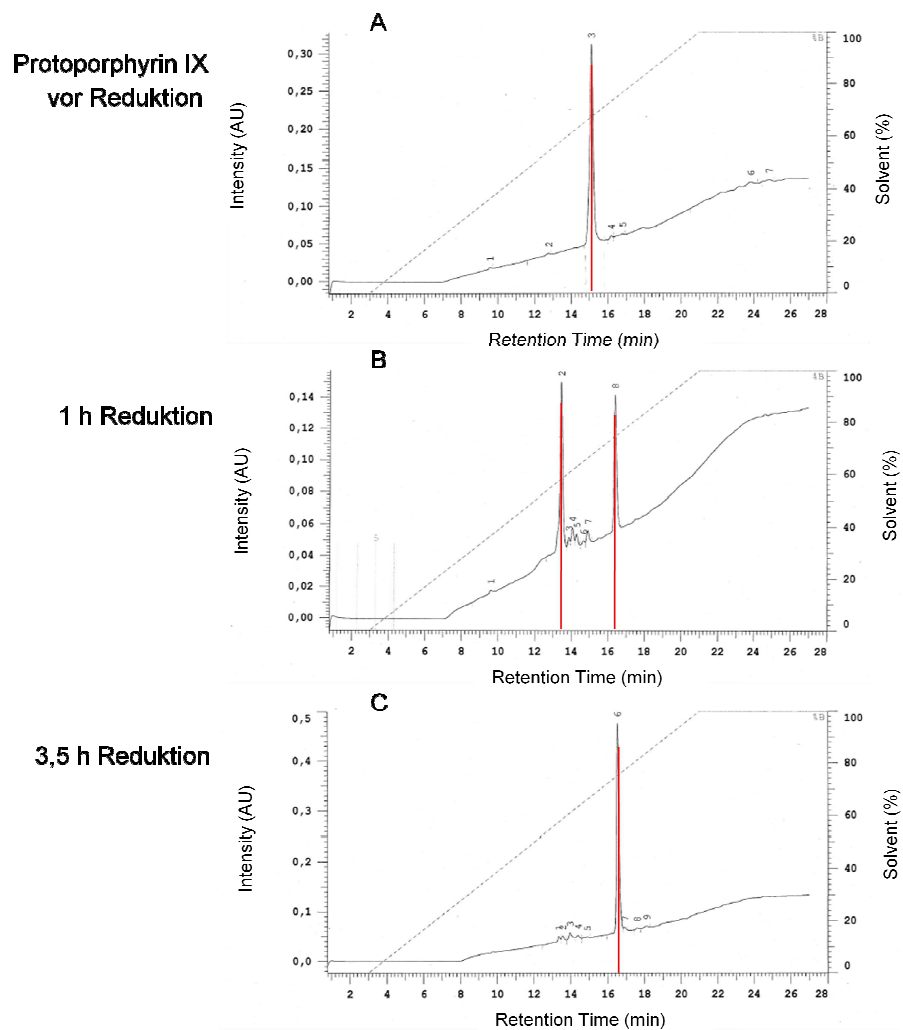


Abbildung 42: HPLC-Messung des Edukts Proto (A), des Zwischenprodukts (B) und Endprodukts (C).

Die Verschiebung des Peaks im Laufe der Reaktionszeit ist deutlich zu sehen. Vor dem Beginn der Reduktion befand sich der Peak für das Edukt Proto auf der Skala der x-Achse bei etwa 15 min (Abbildung 42 A). Nach 1-stündiger Reduktion wurden zwei Peaks bei etwa 13,5 und 16,5 min gemessen (Abbildung 42 B). Nach einer 3,5-stündigen Begasung des Proto mit H_2 war die Reduktion vollständig erfolgt. Zu sehen ist dies in Abbildung 42 (C), hier ist nur noch ein Peak bei etwa 16,5 min zu sehen. Proto'gen, das Produkt dieser Reaktion, oxidiert an der Luft schnell zu Proto, daher wurde es nach der Filtration ohne weitere Aufarbeitung gelöst in Argon-gesättigtem MeOH bei $-70^\circ C$ gelagert. Unmittelbar vor jeder Verwendung des Produkts wurde das MeOH in der Vakuumzentrifuge entfernt und das Proto'gen im Puffer aufgenommen.

Etablierung des PPO-Aktivitätsassays

Das Produkt Proto der enzymatischen Umwandlung des Substrats Proto'gen durch PPO, zeigt bei einer Anregung bei 330 nm eine Fluoreszenzemission bei 620 nm. Die

Entwicklung dieser Fluoreszenzemission bei der Reaktion wurde mit verschiedenen Enzymkonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 43 dargestellt.

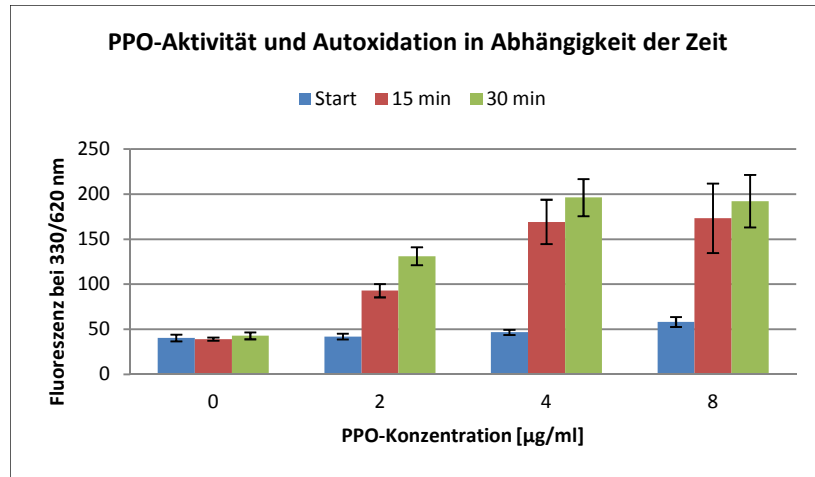


Abbildung 43: Einsatz verschiedener PPO-Konzentrationen.

Proto'gen lag in der Konzentration 150 µM vor. Messung „Start“ steht für sofortige Messung nach Zugabe von Proto'gen.

Bei steigender Konzentration von PPO ist auch eine Zunahme des Signals zu sehen. Der Unterschied der Ergebnisse zwischen 2 und 4 µg/ml PPO ist stärker als zwischen 4 und 8 µg/ml PPO. Da die Ausbeute des isolierten und gereinigten Enzyms limitiert war, wurde der Assay mit der Konzentration 2 µg/ml fortgesetzt, um möglichst viele Substanzen testen zu können. Zur genaueren Charakterisierung der Reaktion wurden die PPO-Aktivität und die Autoxidation im Verlauf einer 1-stündigen Reaktionszeit gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt.

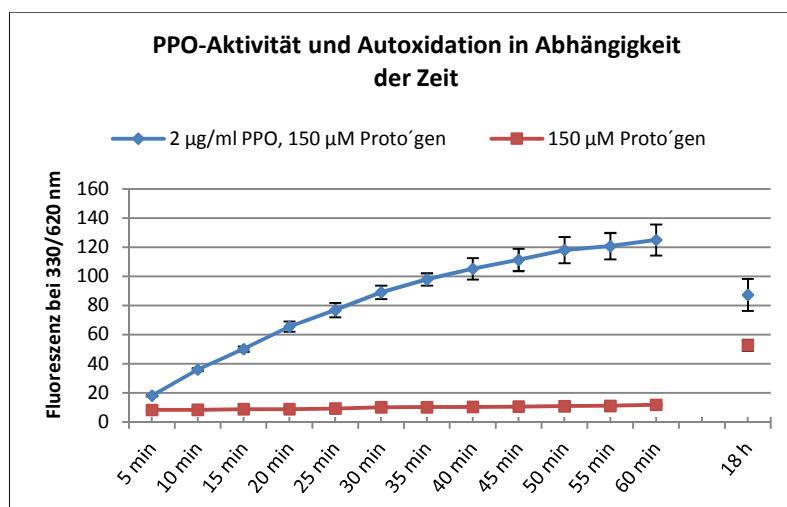


Abbildung 44: Verlauf der enzymatischen PPO-Reaktion und der Autoxidation.

Innerhalb der ersten Stunde war die Autoxidation so gering, dass sie bei der Bestimmung der PPO-Aktivität unberücksichtigt bleiben konnte. Erst bei der Messung nach 18 h sah man einen deutlichen Anstieg der Autoxidation. Relevant für das Screening war die Reaktion innerhalb der ersten Stunde. Als Positivkontrolle wurde Bilirubin eingesetzt. Das Bilirubin ist ein lineares Tetrapyrrol und gelbes Abbauprodukt des Häm-Anteils des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Es fungiert als Inhibitor der PPO (158). Wie in Abbildung 45 gezeigt wird, reduzierte Bilirubin bei einer Konzentration von 250 μM die PPO-Aktivität um etwa 50 %. Die Kontrolle der Autoxidation, das heißt die Messung der Fluoreszenz ohne Zugabe von PPO, diente der Qualitätskontrolle des Substrats. Der Z'-Faktor, errechnet mit den DMSO- und Bilirubin-Kontrollen, ergab 0,74 und war ein Indiz für die Funktionalität des PPO-Aktivitätsassays.

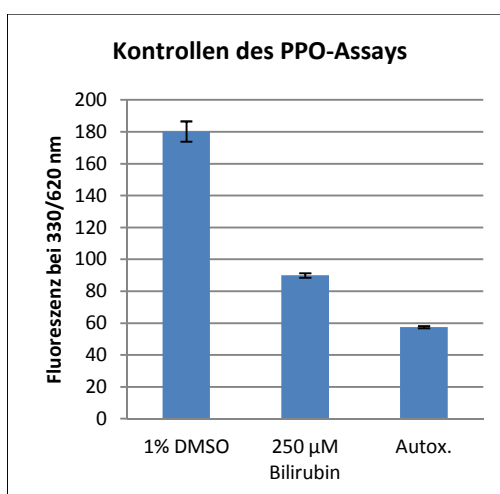


Abbildung 45: Kontrollen des PPO-Assays, Messung nach 60 min.

Enzymreaktion unter Zufuhr von 1 % DMSO entspricht der Negativkontrolle. Zugabe von Bilirubin entspricht der Positivkontrolle. Die Messung der Autoxidation dient der Qualitätsbestimmung des Substrats.

Gleichmäßigkeit des PPO-Aktivitätsassay in 96-Well-Mikrotiterplatten

Für das Screening von Substanzbibliotheken musste eine ausreichende Gleichmäßigkeit des Assays gewährleistet sein. Für die Überprüfung des Tests vor der Durchführung des Screenings wurde die PPO, gelöst im Reaktionspuffer, mit einer Multikanalpipette in einer 96-Well-MTP vorgelegt (außer in den Wells der Autoxidationskontrolle), dann wurden die Substanzen mittels Pipettierroboter zugegeben. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe des Proto'gens mit einer Multikanalpipette. Direkt im Anschluss wurde die erste Messung gemacht. Weitere Messungen folgten alle 10 min. Da nach 60 min die Enzymreaktion abgeschlossen war, entsprach diese Messung beim folgenden Screening der entscheidenden Fluoreszenzdetektion. Abbildung 46 zeigt die Signalverteilung in der Platte ohne Zugabe von Substanzen.

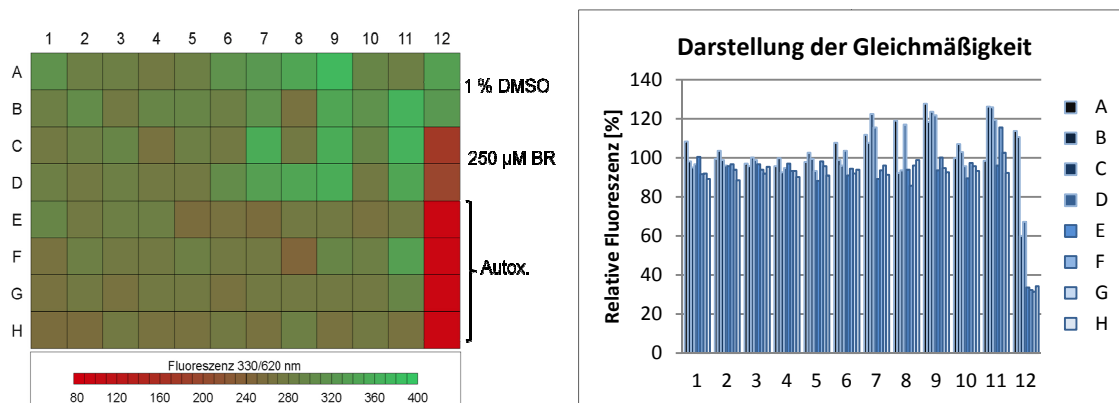


Abbildung 46: Gleichmäßigkeit des PPO-Aktivitätsassays in einer 96-Well-MTP nach 60 min Reaktionszeit.

Um die PPO-Aktivität in Anwesenheit des Lösungsmittels DMSO zu testen, wurde in Spalte 12 A und B 1 % DMSO gegeben. In Spalte 12 C und D befanden sich die Bilirubinkontrollen. In Spalte 12 E bis H befanden sich die Autoxidationkontrollen, zu denen kein Enzym gegeben wurde. Der maximale Wert dieser Platte betrug 128 % PPO-Aktivität in Relation zu dem DMSO-Kontrollwert, und der minimale 89 % Enzymaktivität. Das entsprach einer Standardabweichung von 9 %. In dieser Form war der Assay stabil und aussagekräftig, so dass er bei der Suche nach Inhibitoren der PPO-Aktivität eingesetzt werden konnte. Substanzen, die im Screening die Fluoreszenz um mindestens 40 % reduzierten, wurden als Hits definiert.

3.3.4. Screening verschiedener Substanzsammlungen im PPO-Aktivitätsassay

Auf der Suche nach Substanzen, die die Aktivität der PPO inhibieren, wurden etwa 11.000 Substanzen untersucht. Eingesetzt wurden die Substanzsammlungen NCH, LOPAC, lineare und zyklische Peptide, EMC und VAR in Konzentrationen von 20 bis 40 µM. Abbildung 47 stellt eine Zusammenfassung der relativen PPO-Aktivität nach Zugabe der Substanzen dar. In Tabelle 30 ist aufgeführt, wie viele Substanzen der einzelnen Substanzsammlungen beim initialen Screening inhibitorische Aktivitäten aufwiesen.

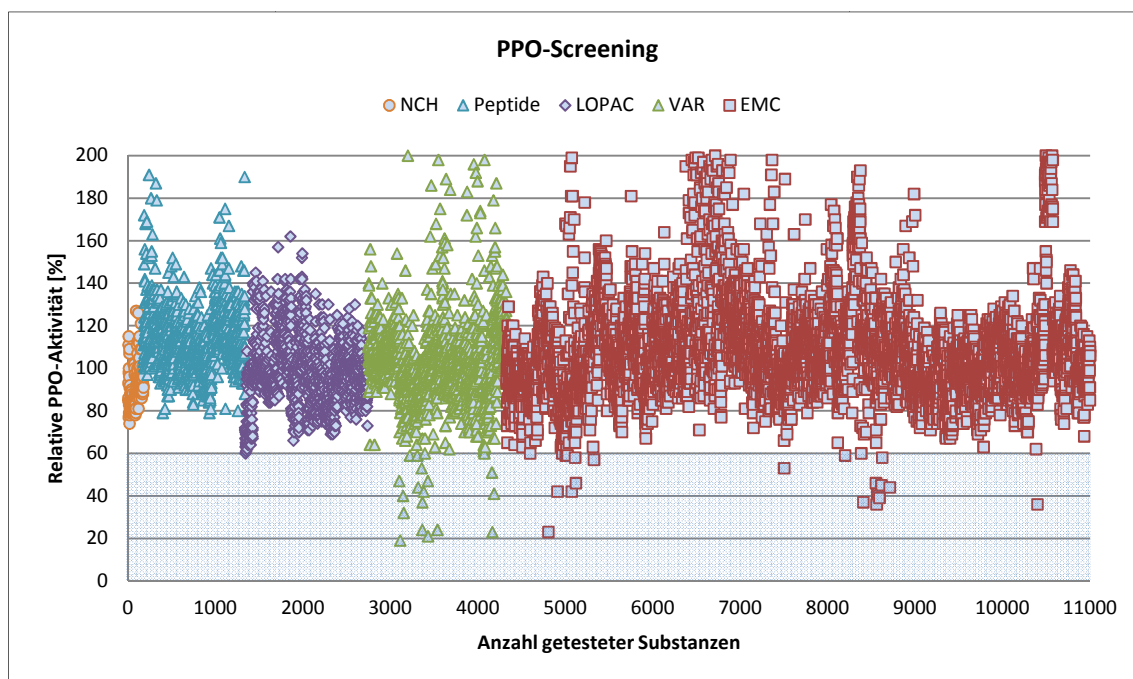


Abbildung 47: Relative PPO-Aktivität unter Einfluss der getesteten Substanzen.

Markierungen im blauen Bereich entsprechen den Substanzen, die beim initialen Screening die gemessene Fluoreszenz um mindestens 40 % reduzierten und somit mögliche PPO-Aktivitätsinhibitoren darstellen.

Tabelle 30: Zusammenfassung der PPO-Aktivitätsinhibitoren.

Sammlung	Anzahl Substanzen ≤ 60 % PPO-Aktivität						Σ
	60-50 %	50-40 %	40-30 %	30-20 %	20-10 %	10-0 %	
NCH	0	0	0	0	0	0	0
Peptide	0	0	0	0	0	0	0
LOPAC	1	0	0	0	0	0	1
VAR	6	6	2	4	1	0	19
EMC	9	8	4	1	0	0	22
							42

Um die ersten Screening-Ergebnisse zu verifizieren, wurden die 42 aktiven Substanzen erneut eingesetzt und getestet. Die meisten Hits des initialen Screenings stellten sich in der Wiederholung als negativ heraus. Nur die Aktivität dreier Substanzen bestätigte sich erneut (siehe Abbildung 48).

Ergebnisse und Diskussion

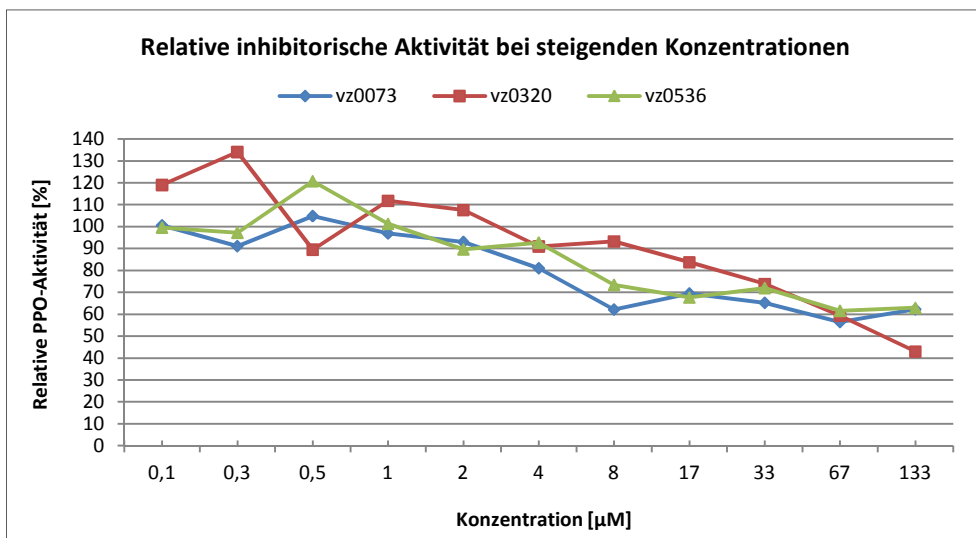
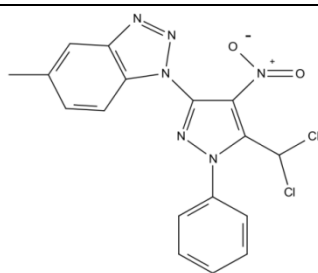


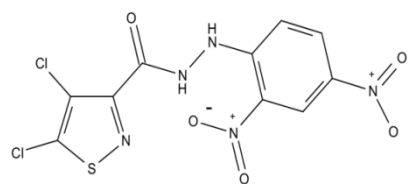
Abbildung 48: Konzentrationsabhängige Aktivität der Substanzen vz0073, vz0320 und vz0536.

Gemessen wurde die Fluoreszenz des nach 60 min entstandenen Produkts Proto.

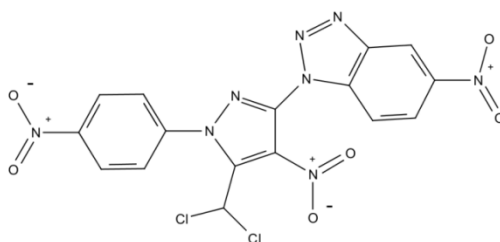
Die inhibitorische Aktivität der drei Substanzen war nicht sehr stark ausgeprägt. Die IC_{50} -Werte lagen für vz0320 bei etwa 100 μM , für vz0073 und vz0536 entsprachen sie > 133 μM . Höhere Konzentrationen wurden im Rahmen dieses Experiments nicht eingesetzt. Trotz der geringen Aktivität ist deutlich eine konzentrationsabhängige Abnahme der PPO-Aktivität zu erkennen. In Abbildung 49 sind die Strukturformeln der im PPO-Aktivitätstest gefundenen Substanzen dargestellt.



vz0073 (VAR, Prof. Kaufmann)



vz0320 (VAR, Prof. Kaufmann)



vz0536 (VAR, Prof. Kaufmann)

Abbildung 49: Code, Hersteller und Strukturformel der Hits des PPO-Aktivitätstests.

Während des Screenings war aufgefallen, dass viele Substanzen eine Eigenfluoreszenz bei der Untersuchungswellenlänge 620 nm hatten, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Eine weitere Möglichkeit zur Verfälschung der Messwerte wäre die Fluoreszenzlöschung (Quenching), die einige chemische Verbindungen verursachen können. Der Effekt der Fluoreszenzlöschung bezeichnet Vorgänge, die eine Abnahme in der Intensität der Fluoreszenz eines Fluorophors zur Folge haben, ohne dass der Fluorophor zerstört wird. Zu den Quenching-Effekten gehören alle Vorgänge, die entweder den angeregten Zustand des Fluorophors strahlungslos in den Grundzustand überführen oder verhindern, dass der Fluorophor in den angeregten Zustand übergehen kann. Dieser Effekt würde zu falsch-positiven Ergebnissen im Assay führen. Um zu ermitteln, ob die aktiven Substanzen einen Effekt auf die Fluoreszenz ausüben, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Aufgrund der geringen gefundenen Aktivitäten und der Fokussierung dieser Arbeit auf die in den Abschnitten 3.1.2 und 3.2.2 beschriebenen Screenings, wurden zu dieser Fragestellung keine weiteren Experimente durchgeführt.

3.4. Adhäsionsassay

3.4.1. Bakterielle Adhäsion

Zu den pathogenen Eigenschaften vieler Bakterien gehört es, dass sie sich an Wirtszellen, Gewebe, Haut und Schleimhaut sowie an inerte Oberflächen wie Katheter, künstliche Herzklappen, Gelenke usw. anheften können (159). Zu der Vielzahl adhäsionsfähiger Keime gehören z. B. *S. aureus* (160), der auf der Haut und den oberen Atemwegen vieler Menschen vorkommt. Etwa 30 % der Bevölkerung trägt diesen Keim in den Nasenvorhöfen, der hier adhäriert und per se nicht pathogen ist. Gelangt dieser jedoch in eine frische Wunde, kann es zu Wundinfektionen kommen. Das Risiko solch einer Infektion ist bei Trägern von *S. aureus* höher als bei Nicht-Trägern. Adhäsionsfähige Keime, die Durchfallerkrankungen hervorrufen, sind z. B. EHEC-Bakterien, die sich im Darm an Epithelzellen anhaften und eine Läsion verursachen (161), ebenso *V. cholerae*, die die Adhäsion für die Pathogenität nutzen. Die beiden wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *V. cholerae*, CT und TCP (siehe 1.1.3), werden von den Bakterien erst nach der Infektion im Darm exprimiert (162) und sind für die Induktion von Cholera essenziell. TCP dient der Kolonisation und Bildung von Mikrokolonien im Darm (28). Eine verminderte Adhäsion bzw. Kolonisation des Darms würde zum zeitnahen Ausscheiden der Bakterien führen und somit die akute Infektionsphase verkürzen oder im besten Fall ganz verhindern. Substanzen, die das Anheften von *V. cholerae* im Darm verhindern oder reduzieren können, sind daher von großem therapeutischem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Hochdurchsatz-fähiger Assay für die Untersuchung von Einflüssen von Substanzen auf die Adhäsion von *V. cholerae* an Epithelzellen entwickelt.

3.4.2. Entwicklung und Etablierung des Adhäsionsassays

Auswahl der Zelllinie und des bakteriellen Stammes

Ziel war es einen Assay zu entwickeln, der möglichst leicht durchführbar und reproduzierbar im Screening vieler Substanzen eingesetzt werden konnte, und der gleichzeitig relevante Ergebnisse bzgl. der intestinalen Situation liefern würde. Initial wurde mit der Zelllinien Caco-2, einer humanen Darmkrebs-Zelllinie gearbeitet (163). Die Caco-2 Zelllinie stellte sich in Voruntersuchungen als ungeeignet heraus, weil die Zellen sich schlecht vereinzeln ließen und ein ungleichmäßiges, inselartiges Wachstum zeigten. Die zweite Zelllinie war IPEC-J2, eine nicht-transformierten intestinalen Zelllinie, abstammend vom Epithel eines neugeborenen, ungesäugten Ferkels (164). IPEC-J2 Zellen ließen sich gut vereinzeln und zeigten ein konfluentes Wachstum. Wie bereits beschreiben wurde, eignen sich IPEC-J2 als *in vitro* Modell für

Adhäsionsanalysen (165). In beiden Fällen handelte es sich um adhärent wachsende Zelllinien.

Als pathogener *V. cholerae* Stamm wurde der in Kapitel 3.3.2 beschriebene Stamm CM-2 eingesetzt. Für die Detektion der Bakterien wurden diese mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert. Das Serum mit dem primären AK wurde von Dr. Christian Erck (Abteilung Zellbiologie, HZI) unter Verwendung des Stamms CM-2 in Mäusen erzeugt. In Kapitel 2.2.6 ist beschrieben, wie dieser Stamm für die AK-Herstellung vorbereitet wurde. Als sekundärer AK wurde der Alexa Fluor® 488 Anti-Maus-AK aus Kaninchen eingesetzt.

Optimierung der Zellzahl, des Inokulums und der Waschschr

Voraussetzung für den Assay war ein gleichmäßiger und konfluent wachsender Zellrasen in allen Wells. Zur Optimierung wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zellen in Wells eingesät und das Wachstum über eine Inkubationsperiode von mehreren Tagen beobachtet. Dabei stellte sich ein Inokulum von 10.000 Zellen pro Well (100.000 Zellen/ml) und eine Inkubation für 5 d bei 37 °C als optimal heraus. Die bakterielle Kultur von *V. cholerae* El Tor Stamm CM-2 wurde im LB Medium für 16 h angezogen, anschließend wurden die Bakterien gewaschen und zu einer bestimmten Konzentration im Zellkulturmedium aufgenommen. Die Adhäsion der Bakterien an die Zellen erfolgte in 96-Well-MTPn für 1 h bei RT. Diese Inkubationsperiode wurde so gewählt, dass die Ergebnisse nicht durch das Bakterienwachstum verfälscht wurden. Der 1-stündige Aufenthalt der Zellen außerhalb des Brutschranks hatte keinen negativen Effekt auf die IPEC-J2 Zellen. Im Anschluss an die Adhäsion wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, um die nicht-adhären

Als besonders schonend stellte sich bei den Waschschr

Vergleich der Quantifizierungsstrategien

Die Bestimmung der adhärenenten Bakterien erfolgte auf zwei Arten. Zum einen wurde die Fluoreszenz der Bakterien mittels eines MTPn-Lesegeräts gemessen. Eine weitere Methode war die Verwendung des automatischen Mikroskops ImageXpress Micro (IXM). Für die Fluoreszenzmessung und die Detektion der Bakterien am IXM wurden diese zunächst mit einem primären, spezifisch gegen *V. cholerae* gerichteten AK und mit einem sekundären fluoreszierenden AK markiert (siehe Abbildung 52). Für die Aufnahme der Bilder am IXM wurden außerdem die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342, einem DNA-Farbstoff, angefärbt. In jedem Well wurden jeweils 9 Aufnahmen gemacht, wie in Abbildung 50 zu sehen ist. Nach der Quantifizierung der Bilder mit der dazugehörigen MetaXpress Software, wurde zum einen die Zahl adhärenenten Bakterien pro Zelle und zum anderen die Fläche dieser Bakterien ermittelt.

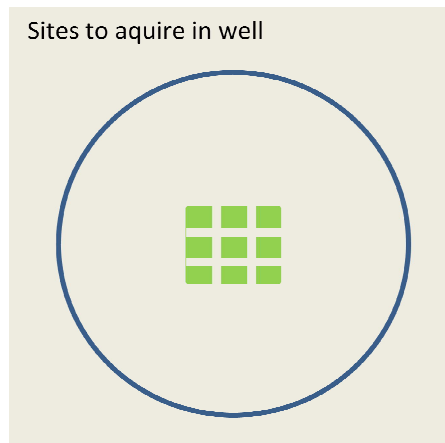


Abbildung 50: Anzahl und Position der Bilder innerhalb eines Wells (96-Well-MTP).

Neben der Zellzahl pro Well wurde auch das Inokulum der Bakterien, das auf den Zellrasen gegeben wurde, optimiert. Eine Testreihe verschiedener Inokula ist in Abbildung 51 zu sehen. Dabei wurden steigende Inokula von 0 (als Kontrollmessung) bis zu einer OD_{600} von 0,35 verwendet.

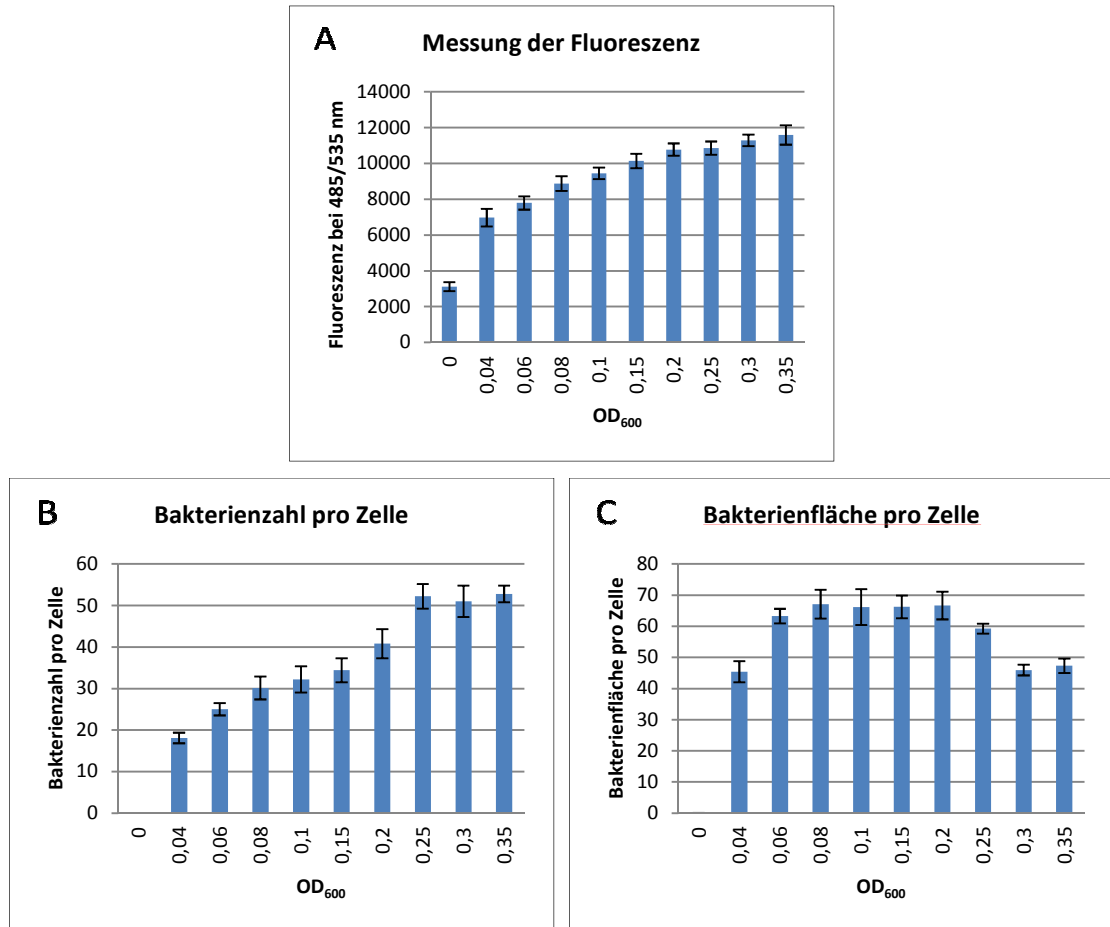


Abbildung 51: Verschiedene Detektionsmethoden der adhärennten Bakterien.

Adhäsionsraten von V. cholerae CM-2 an IPEC-J2 Zellen in Abhängigkeit steigender OD₆₀₀ des Inokulums. Der Kontrollwert „0“ entspricht der Zugabe von Medium ohne Bakterien. A: Messung der Fluoreszenz im MTPn-Lesegerät, B und C: Nach Auswertung der Messungen im IXM.

Anhand der drei Messungen stellte sich heraus, dass ein Inokulum von 0,1 ein gutes Ergebnis lieferte, so dass diese Konzentration im weiteren Verlauf für das Screening verwendet wurde. Bei der Fluoreszenzmessung entsprach der Faktor zwischen der „0-Kontrolle“ und der OD₆₀₀ = 0,1 etwa 3 (siehe Abbildung 51 A). Die Quantifizierung mittels Mikroskop war sensibler als die der Fluoreszenzmessung. Da die „0-Kontrollen“ beider Messungen, Bakterienzahl pro Zelle und Bakterienfläche pro Zelle, niedrige Werte von < 1 hatten, betrug die Differenz zwischen der „0-Kontrolle“ und OD₆₀₀ = 0,1 etwa 32 für Bakterienzahl pro Zelle (siehe Abbildung 51 B) und 66 für Bakterienfläche pro Zelle (siehe Abbildung 51 C). Eine hohe Bakteriendichte (OD₆₀₀ > 0,1) bewirkte ein Verklumpen und ein verstärktes Ablösen der Bakterien während der Waschprozedur, was zu den relativ großen Varianzen beim Parameter Bakterienfläche pro Zelle führte und in Abbildung 51 (C) zu sehen ist.

Einsatz einer adhäsionsinhibierenden Kontrollsubstanz

Da die Substanzen, die im Screening eingesetzt werden sollten in dem Lösungsmittel DMSO vorlagen, wurde dieses als Negativkontrolle gewählt. Als Positivkontrolle wurde Virstatin verwendet, das die Expression von Virulenzgenen, u. a. *ctxAB* und *tcpA*, inhibiert (50) und die intestinale Kolonisation von *V. cholerae* in neugeborenen Mäusen verhindert (144). Die Bakterien wurden zusammen mit den Testsubstanzen 1 h bei RT mit den IPEC-J2 Zellen inkubiert, um die Adhäsion zu ermöglichen. Die mikroskopischen Aufnahmen der Experimente mit den Positiv- und Negativkontrollen sind in Abbildung 52 zu sehen.

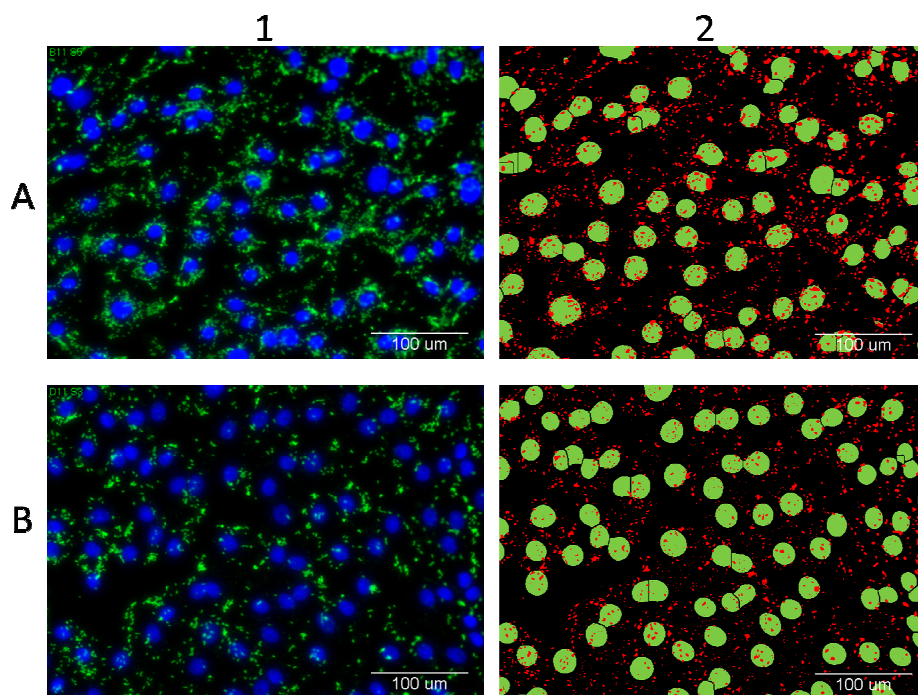


Abbildung 52: Adhäsion von *V. cholerae* an IPEC-J2 Zellen.

Aufnahme nach 1-stündiger Einwirkzeit mit 1 % DMSO (Reihe A) bzw. 100 µM Virstatin (Reihe B). Dargestellt sind blaue Zellkerne und grüne adhärenente Bakterien (Spalte 1). Das Auswertungsmodul des Mikroskops markiert die Zellkerne grün und Bakterien rot (Spalte 2).

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen am MTPn-Lesegerät und der Quantifizierung anhand der mikroskopischen Aufnahmen ergaben die in Abbildung 53 graphisch dargestellten Werte.

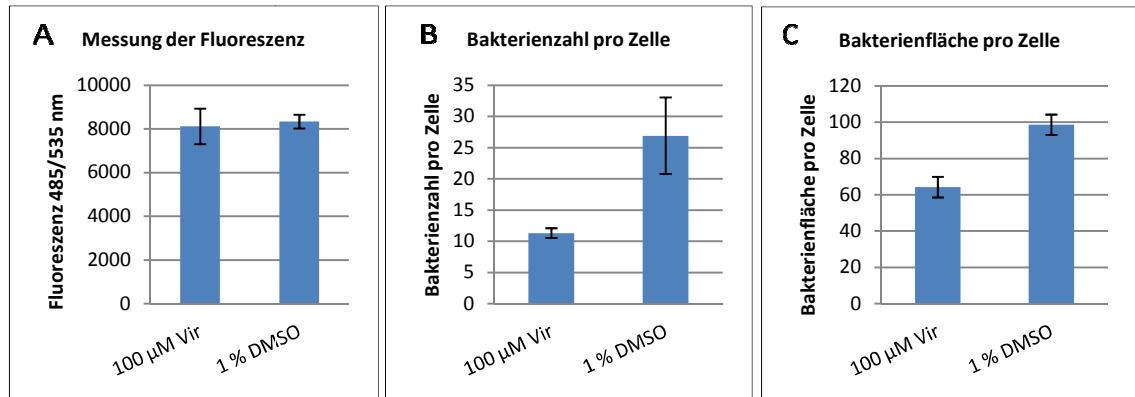


Abbildung 53: Adhäsionsuntersuchung der Positiv- und Negativkontrollen.

Virstatin ist die Positivkontrolle, DMSO entspricht der Negativkontrolle.

In Abbildung 53 (A) ist deutlich zu sehen, dass sich die Werte der Positiv- und Negativkontrolle kaum unterschieden. Dies war erneut ein Zeichen mangelnder Sensitivität dieser Quantifizierungsmethode. Die Auswertungsmethode der Bilder mit der MetaXpress Software des Mikroskops zeigte eine höhere Sensitivität und eignete sich besser für die Detektion (siehe Abbildung 53 B und C). Die Berechnung der Z'-Faktoren durch das Einbeziehen der Positiv- und Negativkontrolle ergab für Messung (A) der Abbildung 53 -14,2, für Messung (B) -0,3 und für Messung (C) 0. Mit diesem Versuch konnte zwar gezeigt werden, dass Virstatin generell einen adhäsionsinhibierenden Effekt hat, und bei einer 100 µmolaren Konzentration die Bakterienzahl pro Zelle um mehr als 50 % reduziert, jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen innerhalb des Versuchs und hieraus resultierenden schlechter Z'-Faktoren, nicht als Positivkontrolle der Adhäsionsinhibierung verwendet werden konnte. Da eine bessere Kontrolle nicht zur Verfügung stand, wurden in den folgenden Versuchen Wells ohne Zugabe von Bakterien als Positivkontrolle gewertet.

Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Werte in einer 96-Well-Mikrotiterplatte

Bei der Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings ist eine möglichst geringe Schwankungsbreite der Werte vorteilhaft und stellt ein Kriterium zur Beurteilung der Qualität dar. Für die Überprüfung der Variabilität der Werte auf der gesamten Mikrotiterplatte wurden zunächst keine Wirkstoffkandidaten eingesetzt, sondern in alle Wells der Spalten 1 bis 11 jeweils 1 % DMSO gegeben. Die Wells der Spalte 12 wurden mit Medium ohne Bakterien versehen. Nach Inkubation, der Anfärbe- und Waschprozedur wurden die Platten mit den beiden auf Seite 110 bereits vorgestellten Quantifizierungsmethoden gemessen und ausgewertet (siehe Abbildung 54).

Ergebnisse und Diskussion

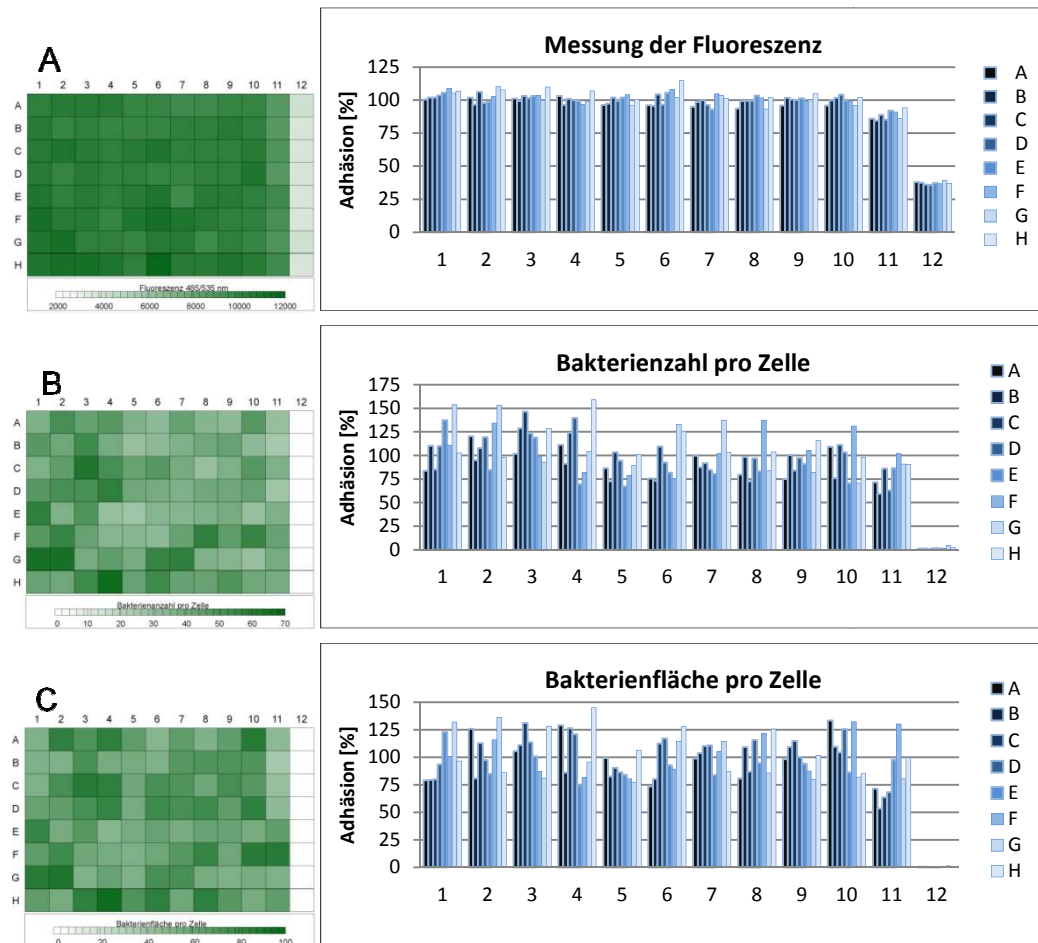


Abbildung 54: Gleichmäßigkeit des Adhäsionsassays in einer 96-Well-MTP.

Gleichmäßigkeit der Platte nach Messung der Fluoreszenz (A), Bildaufnahme am Mikroskop und dessen Quantifizierung mit der MetaXpress Software (B, C).

Nach der Messung und Auswertung wurde für jede Methode der Z'-Faktor berechnet. Methode 1 hatte den Faktor 0,7, die Auswertungen der mikroskopischen Aufnahmen hatten den Faktor 0,3 für Bakterienanzahl und 0,4 für Bakterienfläche pro Zelle. Unter diesen Voraussetzungen konnte gezeigt werden, dass die Qualität des Assays im akzeptablen Bereich lag. Die Messwerte der Fluoreszenz waren relativ gleichmäßig und entsprachen max. 115 % und min. 85 %, die Standardabweichung lag bei 5 % (siehe Abbildung 54 A). Bei den mikroskopischen Aufnahmen variierten die Messwerte relativ stark innerhalb der Platte. Die Bakterienzahl pro Zelle lag max. bei 159 % und min. bei 59 %, somit hatte man eine Standardabweichung von 22 % (siehe Abbildung 54 B). Die Bakterienfläche pro Zelle war max. 145 % und min. 53 %, die Standardabweichung entsprach 19 % (siehe Abbildung 54 C). In dieser Form hätte der Assay im Falle eines Screenings, aktive Substanzen nicht zuverlässig detektieren können. Ein Grund für diese Schwankungen war ein sporadisch auftauchendes Fokusproblem am automatischen Mikroskop. Es erscheint aber möglich, durch

parallele Anwendung der drei Quantifizierungsmethoden und des Vergleichs der Ergebnisse, aktive Substanzen im Screeningverfahren zu detektieren. Aufgrund der Fokussierung dieser Arbeit auf die in den Abschnitten 3.1.2, 3.2.2 und 3.3.4 beschriebene Screenings wurden zum Adhäsionsassay keine weiteren Experimente durchgeführt.

4. Ausblick

Im Folgenden werden die Ausführungen entsprechend der vier adressierten experimentellen Ansätze gemacht.

1. In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Wachstumsassay drei neue antimikrobielle Substanzen identifiziert. Substanz vz0825 war die aktivste, mit MHK-Werten von 0,8 μM und 1,6 μM in den *Vibrio cholerae* El Tor Stämmen NM06-058 und N16961. Der erste Ansatz zur Targetidentifizierung war das Mutation-Mapping von gegen vz0825 resistenten *V. cholerae* Mutanten. Für die Genompool-Analyse wurde die Paired-End Sequenziermethode genutzt, eine relativ neuen Methode mit großem Potential (166), die es ermöglicht ganze Genome innerhalb kurzer Zeit und mit relativ geringem Kostenaufwand zu sequenzieren. Durch die Anwendung dieser Technologie zur Genompool-Sequenzierung kann eine Vielzahl an Informationen gewonnen werden, die hier zur Aufklärung neuer Wirkmechanismen genutzt wurde. Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der identifizierten dominanten Punktmutation im Gen VC_A0531, das eine Sensor-Histidinkinase kodiert, sollten jeweils Kolonie-PCR Analysen der 15 resistenten Mutanten mit spezifisch modifizierten Primern angefertigt werden. Die Amplifikate sollen sequenziert werden, um die Punktmutationen zu bestätigen und für die einzelnen Mutanten genauer zu quantifizieren. Weitere resistente Mutanten könnten hergestellt und dahingehend untersucht werden, ob das Gen VC_A0531 an der gleichen Position erneut eine Mutation trägt. Inwieweit das VC_A0531 Gen für das Überleben der Bakterien essentiell ist, könnte anhand von Deletionsmutanten analysiert werden. Eine spezifische Punktmutation wäre der Austausch von dem Nukleotid, der auf Position 283 der Sensor-Histidinkinase zum Einbau eines Methionins anstelle von Threonin führt. Sollten diese Mutanten im Vergleich zum Wt resistent gegen Substanz vz0825 sein, wäre dies ein Beweis für das Wirkstofftarget in der bakteriellen Zelle. Anhand der Ergebnisse aus der Genompool-Analyse der resistenten Mutanten, scheint die Substanz vz0825 einen Effekt auf die entsprechende Histidinkinase auszuüben. Ein Wirkstoff, der auf der Ebene der Signalübertragung durch das Zweikomponentensystem, genauer der Histidinkinase, eingreift, wäre von großem Interesse aufgrund des Fehlens dieser Kinasen bei höheren Eukaryoten (167). Die spezifische Wirkung auf dieser Ebene hätte vermutlich wenig Nebeneffekte auf eukaryotische Zellen (Toxizität) und wäre möglicherweise geeignet als antimikrobieller Wirkstoff. Anhand dieser Tatsache sollte die Substanz vz0825 unbedingt in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

Im Verlauf weiterer Arbeiten bietet sich an, die Versuche zur Generierung von Resistenzen gegen die anderen beiden antimikrobiellen Wirkstoffe wieder

aufzunehmen. Unter Verwendung anderer Stämme wäre diese Methode evtl. erfolgreicher. Die Sequenzierung von Mutanten-Genom-pools und das Mutation-Mapping könnte auch zur Target-identifizierung der Substanzen vz0500 und 1541-0004 eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung des Wirkmechanismus ist ein Vergleich der Musteranalyse des Proteomprofils der 2D-SDS-Gelelektrophorese von Bakterien, die mit den neu gefundenen Substanzen inkubiert wurden, im Vergleich mit den Mustern bei Einwirkung mit bekannten Antibiotika (108).

2. Beim CT-Assay kamen drei Substanzen in die engere Auswahl, deren Target sich anhand des gewählten Reporterstamms MO10 pAKSB in der QS-Signalkaskade befinden muss und demnach an der Regulation der Virulenzgenexpression beteiligt ist. Um das genaue Targetgen, das am QS oder der upstream liegenden Virulenzgenexpression beteiligt ist zu evaluieren, könnte die Methode der qRT-PCR auf weitere regulatorische Gene ausgedehnt werden. Das initiale Ergebnis der nachweislich reduzierten *aphA*-Expression sollte in einer weiteren qRT-PCR Untersuchung bestätigt werden. Um eine konzentrationsabhängige Aktivität in der qRT-PCR zeigen zu können, sollten außerdem zur Festigung der bisherigen Ergebnisse, mehrere Konzentrationen der aktiven Substanzen eingesetzt werden. Microarray-Analysen von Kulturen, die mit den aktiven Substanzen behandelt wurden, könnten eine Fülle an Informationen bezüglich der Transkription-Level diverser Gene in der bakteriellen Zelle liefern. Die ersten Microarray-Analysen wurden vom indischen Projektpartner unter Einsatz einer weiteren in dieser Arbeit identifizierten aktiven Substanz, 53760866, durchgeführt. Die Transkriptomanalysen der drei aktivsten Substanzen sollten folgen.

Neben den Expressionsmechanismen bestimmter Gene, könnte auch die Sekretion des Cholera-toxins aus der bakteriellen Zelle betroffen sein. Die hier angewandte Western Blot Methode zur Analyse der CT-Sekretion aus der bakteriellen Zelle lieferte diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse. Hier sollte in einem modifizierten Ansatz erneut die CT-Sekretion adressiert werden. Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob die Expression des TCP reduziert wird, ist der Einsatz von vz0852, vz0761 und 53761188 in den hier etablierten Adhäsionsassay.

Da der CT-Assay stabil und reproduzierbar ist, kann das Screening nach weiteren „Pathoblockern“ mit dem Reporterstamm MO10 pAKSB fortgesetzt werden. Der Vorteil solcher Substanzen ist, dass nicht das Wachstum, sondern die Menge des sekretierten CTs und somit die Pathogenität von *V. cholerae* reduziert wird. Substanzen mit diesen Eigenschaften wirken spezifisch auf eine Bakterienart und stören somit nicht z. B. die physiologische Darmflora von Patienten. Außerdem kann vermutet werden, dass der Selektionsdruck, der von diesen Wirkstoffen ausgeht, geringer ist und die Entwicklung von Resistenzen verzögert wird.

3. Der PPO-Assay ist ein enzymbasierter Aktivitätsassay. Bei dem Screening wurden drei Substanzen gefunden, die eine Reduktion der Fluoreszenz herbeiführten, die durch die PPO-Umsetzung des Substrats zum Produkt verursacht wurde. In weiteren Untersuchungen sollte eine evtl. vorliegende Eigenfluoreszenz oder ein Fluoreszenz-Quenching der Verbindungen untersucht werden. Unter Berücksichtigung der relativ geringen Aktivitäten der gefundenen Substanzen mit IC_{50} -Werten von 100 μ M und $> 133 \mu$ M, wäre eine Fortsetzung des Screenings sinnvoll.

Da die Aktivität bzw. das Target in dieser Art von Assay, im Gegensatz zum Wachstums- und CT-Assay eindeutig ist, sollte untersucht werden wie aktive Substanzen auf ganze *V. cholerae* Zellen wirken. Auch hier wären sowohl Transkriptom-, wie auch Proteomanalysen möglich. Im Rahmen der Evaluierung sollte die Zytotoxizität der aktiven Substanzen in einem MTT-Test bestimmt werden.

4. Die Entwicklung und Evaluierung eines zellbasierten Adhäsionsassays mit *V. cholerae* und der IPEC-J2 Zelllinie im 96-Well-MTPn Format war erfolgreich. Durch die Berücksichtigung aller in Kapitel 3.4.2 vorgestellten Quantifizierungsmethoden ist eine zuverlässige Auswertungsmöglichkeit von Screening-Kampagnen gegeben. Der Assay kann in der ausgearbeiteten Form für die Entwicklung von Adhäsions-inhibierenden Substanzen eingesetzt werden.

Inwiefern die insgesamt 9 aktiven Substanzen aus den Assays einen Effekt auf eukaryotische Zellen ausüben, könnte zusätzlich zu den klassischen Toxizitätstests mit Hilfe von High-Content-Analysen untersucht werden. Dabei würden mögliche phänotypische Veränderungen der Epithelzellen untersucht werden. Bei diesen Analysen werden die Zellen mit verschiedenen Substanzen bekannter Wirkmechanismen sowie mit den Wirkstoffkandidaten inkubiert und anschließend unter Anwendung von Fluoreszenzmikroskopie phänotypisch untersucht. Durch den Vergleich der phänotypischen Veränderungen, herbeigeführt durch bekannte Substanzen und durch Wirkstoffkandidaten, können Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen gewonnen werden (107). Eine weitere Möglichkeit Veränderungen in der High-Content-Analyse zu detektieren, ist die Messung der Impedanz von Epithelzellen in 96-Well-MTPn, die mit dem xCELLigence System durchgeführt werden kann (168). Dabei entstehen unter Einfluss von Wirkstoffen spezifische Impedanzkurven, die untereinander verglichen werden können. Auch diese Methode bietet eine Möglichkeit zur Aufklärung von Wirkmechanismen.

Zur Optimierung der neu entdeckten Wirkstoffkandidaten sollten Methoden der Medizinischen Chemie angewandt werden. Die modifizierten Strukturen sollten erneut auf ihre Aktivität und Zytotoxizität *in vitro*, aber auch *in vivo* z. B. in Mausmodellen

überprüft werden. Der Übergang von den *in vitro* Methoden zu den *in vivo* Tiermodellen ist sinnvoll bei Molekülen mit einer sehr guten Aktivität, bestenfalls im nmolaren Bereich und einer sehr geringen bis keinen Zytotoxizität auf Zellkulturen, die nach der Modifikation evtl. gegeben wären. Für die *in vivo* Untersuchung der Wirksamkeit gegen durch *V. cholerae* hervorgerufene Cholera-Infektionen, stehen drei geeignete Tiermodelle zur Verfügung, das Rabbit Ileal Loop Modell zur Entwicklung von Impfstoffen (169), das RITARD (*removable intestinal tie-adult rabbit diarrhea*) Modell (170) und ein Mausmodell mit neugeborenen Mäusen (171, 172) für die Simulation einer Cholera-Infektion.

Im Allgemeinen wäre die Fortsetzung des Screenings aller vier vorgestellten Assays mit anderen Substanzsammlungen wünschenswert.

5. Literaturverzeichnis

1. **Saha, P. K., Koley, H., Mukhopadhyay, A. K., Bhattacharya, S. K., Balakrish Nair, G., Ramakrishnan, B. S., Krishnan, S., Takeda, T., and Takeda, Y. (1996)** Nontoxigenic vibrio cholerae O1 serotype inaba bio type El tor associated with a cluster of cases of cholera in Southern India, *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1114-1117.
2. **Sharma, C., Thungapathra, M., Ghosh, A., Mukhopadhyay, A. K., Basu, A., Mitra, R., Basu, I., Bhattacharya, S. K., Shimada, T., Ramamurthy, T., Takeda, T., Yamasaki, S., Takeda, Y., and Nair, G. B. (1998)** Molecular analysis of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India, *Journal of Clinical Microbiology* 36, 756-763.
3. **Colwell, R. R., Kaper, J., and Joseph, S. W. (1977)** Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay, *Science* 198, 394-396.
4. **Colwell, R. R. (1996)** Global climate and infectious disease: The cholera paradigm, *Science* 274, 2025-2031.
5. **Garay, E., Arnau, A., and Amaro, C. (1985)** Incidence of Vibrio cholerae and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle, *Applied and Environmental Microbiology* 50, 426-430.
6. **Huq, A., Colwell, R. R., Rahman, R., Ali, A., Chowdhury, M. A. R., Parveen, S., Sack, D. A., and Russek-Cohen, E. (1990)** Detection of Vibrio cholerae O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods, *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2370-2373.
7. **Nalin, D. R., Daya, V., and Reid, A. (1979)** Adsorption and growth of Vibrio cholerae on chitin, *Infection and Immunity* 25, 768-770.
8. **Yildiz, F. H., and Schoolnik, G. K. (1999)** Vibrio cholerae O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4028-4033.
9. **Watnick, P. I., and Kolter, R. (1999)** Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm, *Molecular Microbiology* 34, 586-595.
10. **Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L., and Kolter, R. (2001)** The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in Vibrio cholerae O139, *Molecular Microbiology* 39, 223-235.

11. **Wai, S. N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S. I., and Yoshida, S. I. (1998)** Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation, *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3648-3655.
12. **Watnick, P., and Kolter, R. (2000)** Biofilm, city of microbes, *Journal of Bacteriology* 182, 2675-2679.
13. **Epstein, P. R. (1993)** Algal blooms in the spread and persistence of cholera, *BioSystems* 31, 209-221.
14. **Colwell, R. R., and Spira, W. M. (1992)** The ecology of Vibrio cholerae. In: Cholera (Barua, D. and Greenough III, W. B., Eds.), *Plenum, New York*, pp. 107-127.
15. **Karaolis, D. K. R., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B., and Reeves, P. R. (1998)** A Vibrio cholerae pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3134-3139.
16. **Faruque, S. M., Albert, M. J., and Mekalanos, J. J. (1998)** Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1301-1314.
17. http://de.wikipedia.org/wiki/Vibrio_cholerae.
18. **Mukhopadhyay, A. K., Chakraborty, S., Takeda, Y., Nair, G. B., and Berg, D. E. (2001)** Characterization of VPI pathogenicity island and CTX Φ prophage in environmental strains of Vibrio cholerae, *Journal of Bacteriology* 183, 4737-4746.
19. **Waldor, M. K., Rubin, E. J., Pearson, G. D. N., Kimsey, H., and Mekalanos, J. J. (1997)** Regulation, replication, and integration functions of the Vibrio cholerae CTX Φ are encoded by region RS2, *Molecular Microbiology* 24, 917-926.
20. **Faruque, S. M., Asadulghani, Kamruzzaman, M., Nandi, R. K., Ghosh, A. N., Balakrish Nair, G., Mekalanos, J. J., and Sack, D. A. (2002)** RS1 element of Vibrio cholerae can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTX Φ , *Infection and Immunity* 70, 163-170.
21. **Pollitzer, R., Swaroop, S., and Burrows, W. (1959)** Cholera, *Monograph series. World Health Organization* 58, 1001-1019.
22. **Safa, A., Nair, G. B., and Kong, R. Y. C. (2010)** Evolution of new variants of Vibrio cholerae O1, *Trends in Microbiology* 18, 46-54.
23. **WHO. (2011)** Cholera, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>.

24. **WHO. (2006)** Cholera 2005, *Weekly epidemiological record* 31 81, 297–308.
25. **WHO. (2000)** WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, *Document WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1*.
26. **Cash, R. A., Music, S. I., and Libonati, J. P. (1974)** Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum, *Journal of Infectious Diseases* 129, 45-52.
27. **Dizon, J. J., Fukumi, H., Barua, D., Valera, J., Jayme, F., Gomez, F., Yamamoto, S. I., Wake, A., Gomez, C. Z., Takahira, Y., Paraan, A., Rolda, L., Alvero, M., Abou-Gareeb, A. H., Kobari, K., and Azurin, J. C. (1967)** Studies on cholera carriers, *Bulletin of the World Health Organization* 37, 737-743.
28. **Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B., and Mekalanos, J. J. (1987)** Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 2833-2837.
29. **Peterson, K. M., and Mekalanos, J. J. (1988)** Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: Identification of novel genes involved in intestinal colonization, *Infection and Immunity* 56, 2822-2829.
30. **Franzon, V. L., Barker, A., and Manning, P. A. (1993)** Nucleotide sequence encoding the mannose-fucose-resistant hemagglutinin of *Vibrio cholerae* O1 and construction of a mutant, *Infection and Immunity* 61, 3032-3037.
31. **Bina, J. E., and Mekalanos, J. J. (2001)** *Vibrio cholerae* *tolC* is required for bile resistance and colonization, *Infection and Immunity* 69, 4681-4685.
32. **Carroll, P. A., Tashima, K. T., Rogers, M. B., DiRita, V. J., and Calderwood, S. B. (1997)** Phase variation in *tcpH* modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology* 25, 1099-1111.
33. **Champion, G. A., Neely, M. N., Brennan, M. A., and DiRita, V. J. (1997)** A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains, *Molecular Microbiology* 23, 323-331.
34. **Provenzano, D., and Klose, K. E. (2000)** Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10220-10224.
35. **Chiang, S. L., and Mekalanos, J. J. (1998)** Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization, *Molecular Microbiology* 27, 797-805.

36. **Goldberg, M. B., DiRita, V. J., and Calderwood, S. B. (1990)** Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using TnphoA mutagenesis, *Infection and Immunity* 58, 55-60.
37. **Baselski, V. S., Upchurch, S., and Parker, C. D. (1978)** Isolation and phenotypic characterization of virulence deficient mutants of *Vibrio cholerae*, *Infection and Immunity* 22, 181-188.
38. **Baselski, V. S., Medina, R. A., and Parker, C. D. (1979)** In vivo and in vitro characterization of virulence-deficient mutants of *Vibrio cholerae*, *Infection and Immunity* 24, 111-116.
39. **Chiang, S. L., and Mekalanos, J. J. (1999)** rfb Mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization, *Infection and Immunity* 67, 976-980.
40. **Nesper, J., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Kapfhammer, D., Kraiř, A., and Reidl, J. (2001)** Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and galE mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation, *Infection and Immunity* 69, 435-445.
41. **Herrington, D. A., Hall, R. H., Losonsky, G., Mekalanos, J. J., Taylor, R. K., and Levine, M. M. (1988)** Toxin, toxin-coregulated pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans, *Journal of Experimental Medicine* 168, 1487-1492.
42. **Kirn, T. J., Lafferty, M. J., Sandoe, C. M. P., and Taylor, R. K. (2000)** Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology* 35, 896-910.
43. **Reid, J. M., Benson, J. W., Viallet, J., and Ames, M. M. (1995)** Preclinical pharmacology of cholera toxin, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 36, 115-120.
44. **Thiagarajah, J. R., and Verkman, A. S. (2005)** New drug targets for cholera therapy, *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 172-175.
45. **Heidelberg, J. F., Elsen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Halving, Q., Dragol, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Niernan, W. C., White, O., Saizberg, S. L., Smith, H. O., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J., Venter, C. J., and Fraser, C. M. (2000)** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*, *Nature* 406, 477-483.

46. **Higgins, D. E., Nazareno, E., and DiRita, V. J. (1992)** The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators, *Journal of Bacteriology* 174, 6974-6980.
47. **Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J. L. (1997)** AraC/Xyls family of transcriptional regulators, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 393-410.
48. **Martin, R. G., and Rosner, J. L. (2001)** The AraC transcriptional activators, *Current Opinion in Microbiology* 4, 132-137.
49. **Gupta, S., and Chowdhury, R. (1997)** Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*, *Infection and Immunity* 65, 1131-1134.
50. **Shakhnovich, E. A., Hung, D. T., Pierson, E., Lee, K., and Mekalanos, J. J. (2007)** Virstatin inhibits dimerization of the transcriptional activator ToxT, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2372-2377.
51. **Nielsen, A. T., Dolganov, N. A., Rasmussen, T., Otto, G., Miller, M. C., Felt, S. A., Torreilles, S., and Schoolnik, G. K. (2010)** A bistable switch and anatomical site control *vibrio cholerae* virulence gene expression in the intestine, *PLoS Pathogens* 6, 1-23.
52. **Withey, J. H., and DiRita, V. J. (2006)** The toolbox: Specific DNA sequence requirements for activation of *Vibrio cholerae* virulence genes by ToxT, *Molecular Microbiology* 59, 1779-1789.
53. **Matson, J. S., Withey, J. H., and DiRita, V. J. (2007)** Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression, *Infection and Immunity* 75, 5542-5549.
54. **Skorupski, K., and Taylor, R. K. (1997)** Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli, *Molecular Microbiology* 25, 1003-1009.
55. **Beck, N. A., Krukonis, E. S., and DiRita, V. J. (2004)** TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP, *Journal of Bacteriology* 186, 8309-8316.
56. **Behari, J., Stagon, L., and Calderwood, S. B. (2001)** pepA, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology* 183, 178-188.
57. **Kovacikova, G., Lin, W., and Skorupski, K. (2004)** *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the tcpPH promoter, *Molecular Microbiology* 53, 129-142.

58. **Dirita, V. J., Neely, M., Taylor, R. K., and Bruss, P. M. (1996)** Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over toxT expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7991-7995.
59. **Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2002)** Binding site requirements of the virulence gene regulator AphB: Differential affinities for the *Vibrio cholerae* classical and El Tor tcpPH promoters, *Molecular Microbiology* 44, 533-547.
60. **Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2000)** Differential activation of the tcpPH promoter by AphB determines biotype specificity of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology* 182, 3228-3238.
61. **Hammer, B. K., and Bassler, B. L. (2003)** Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology* 50, 101-114.
62. **Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., and Bassler, B. L. (2002)** Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*, *Cell* 110, 303-314.
63. **Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2002)** Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the aphA promoter, *Molecular Microbiology* 46, 1135-1147.
64. **Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., and Hughson, F. M. (2002)** Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron, *Nature* 415, 545-549.
65. **Lenz, D. H., Miller, M. B., Zhu, J., Kulkarni, R. V., and Bassler, B. L. (2005)** CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology* 58, 1186-1202.
66. **Camara, M., Hardman, A., Williams, P., and Milton, D. (2002)** Quorum sensing in *Vibrio cholerae*, *Nature Genetics* 32, 217-218.
67. **Freeman, J. A., and Bassler, B. L. (1999)** Sequence and function of LuxU: A two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*, *Journal of Bacteriology* 181, 899-906.
68. **Freeman, J. A., and Bassler, B. L. (1999)** A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*, *Molecular Microbiology* 31, 665-677.
69. **Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., and Bassler, B. L. (2004)** The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*, *Cell* 118, 69-82.

70. **Lilley, B. N., and Bassler, B. L. (2000)** Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54, *Molecular Microbiology* 36, 940-954.
71. **Lin, W., Kovacikova, G., and Skorupski, K. (2005)** Requirements for *Vibrio cholerae* HapR Binding and Transcriptional Repression at the hapR Promoter Are Distinct from Those at the aphA Promoter, *J. Bacteriol.* 187, 3013-3019.
72. **Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., and Mekalanos, J. J. (2002)** Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3129-3134.
73. **Greenough III, W. B., Rosenberg, I. S., Gordon Jr, R. S., Davies, B. I., and Benenson, A. S. (1964)** Tetracycline in the treatment of cholerae., *The Lancet* 283, 355-357.
74. **Lindenbaum, J., Greenough, W. B., and Islam, M. R. (1967)** Antibiotic therapy of cholera, *Bulletin of the World Health Organization* 36, 871-883.
75. **Pierce, N. F., Banwell, J. G., Mitra, R. C., Caranasos, G. J., Keimowitz, R. I., Thomas, J., and Mondal, A. (1968)** Controlled comparison of tetracycline and furazolidone in cholera, *British medical journal* 3, 277-280.
76. **Pavlic, I. M. (2005)** Cholera und Montezumas Rache - Dukoral: Neue Impfmöglichkeit gegen häufige Durchfallerkrankungen auf Reisen, *ImpfDialog* 1, 31-34.
77. **Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., and Tenover, R. H., (Eds.) (1999)** *Manual of Clinical Microbiology*, 7 ed., ASM Press, Washington D. C.
78. **Phillips, K. F., and Hailey, F. J. (1986)** The use of furoxone: A perspective, *Journal of International Medical Research* 14, 19-29.
79. **Ghosh, A., and Ramamurthy, T. (2011)** Antimicrobials & cholera: Are we stranded?, *Indian Journal of Medical Research* 133, 225-231.
80. **Paulsen, I. T., Brown, M. H., and Skurray, R. A. (1996)** Proton-dependent multidrug efflux systems, *Microbiological Reviews* 60, 575-608.
81. **Allen, J. G., Atherton, F. R., and Hall, M. J. (1979)** Phosphono-peptides as antibacterial agents: Alaphosphin and related phosphono-peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15, 684-695.
82. **Gellert, M., Mizuuchi, K., and O'Dea, M. H. (1977)** Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 4772-4776.

83. **Goss, W. A., Deitz, W. H., and Cook, T. M. (1965)** Mechanism of action of nalidixic acid on *E. coli*. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis., *Journal of Bacteriology* 89, 1068-1074.
84. **Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N., and Cozzarelli, N. R. (1977)** Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 4767-4771.
85. **Waldor, M. K., Tschäpe, H., and Mekalanos, J. J. (1996)** A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139, *Journal of Bacteriology* 178, 4157-4165.
86. **Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S. M., Woodgate, R., and Waldor, M. K. (2001)** Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2991-3000.
87. **Burrus, V., Marrero, J., and Waldor, M. K. (2006)** The current ICE age: Biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements, *Plasmid* 55, 173-183.
88. **Hedges, R. W., and Jacob, A. E. (1975)** A 98 megadalton R factor of compatibility group C in a *Vibrio cholerae* El Tor isolate from Southern U.S.S.R., *Journal of General Microbiology* 89, 383-386.
89. **Glass, R. I., Huq, M. I., and Lee, J. V. (1983)** Plasmid-borne multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* serogroup O1, biotype El Tor: Evidence for a point-source outbreak in Bangladesh, *Journal of Infectious Diseases* 147, 204-209.
90. **Burbaum, J. J. (1998)** Miniaturization technologies in HTS: How fast, how small, how soon?, *Drug Discovery Today* 3, 313-322.
91. **Martis, E. A., Radhakrishnan, R., and R., B. R. (2011)** High-Troughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery- An Overview, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01, 02-10.
92. **DIN 58940-7. (2009)** Medizinische Mikrobiologie - Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika - Teil 7: Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) mit der Mikrobouillondilutionsmethode; Text Deutsch und Englisch.
93. **Möbius, K. (2008)** Electron Transport Chain coupled Protoporphyrinogen IX Oxidase from *Escherichia coli*, PhD, *Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig*.

94. **Bergonia, H. A., Phillips, J. D., and Kushner, J. P. (2009)** Reduction of porphyrins to porphyrinogens with palladium on carbon, *Analytical Biochemistry* 384, 74-78.
95. **Vila, J., Sánchez-Céspedes, J., and Giralt, E. (2005)** Old and new strategies for the discovery of antibacterial agents, *Current Medicinal Chemistry: Anti-Infective Agents* 4, 337-353.
96. **Barker, L. P., Porcella, S. F., Wyatt, R. G., and Small, P. L. C. (1999)** The Mycobacterium marinum G13 promoter is a strong sigma 70-like promoter that is expressed in Escherichia coli and mycobacteria species, *FEMS Microbiology Letters* 175, 79-85.
97. **Nandi, B., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, S., Nair, G. B., Shimada, T., and Ghose, A. C. (2000)** Rapid method for species-specific identification of Vibrio cholerae using primers targeted to the gene of outer membrane protein Omp W, *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4145-4151.
98. **Zhang, J. H., Chung, T. D. Y., and Oldenburg, K. R. (1999)** A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *Journal of Biomolecular Screening* 4, 67-73.
99. **Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., and Müller, R. (2003)** Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - Past and future biotechnological aspects with the focus on the genus Sorangium, *Journal of Biotechnology* 106, 233-253.
100. **Elnakady, Y. A., Sasse, F., Lünsdorf, H., and Reichenbach, H. (2004)** Disorazol A1, a highly effective antimitotic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells, *Biochemical Pharmacology* 67, 927-935.
101. **Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K., and Reichenbach, H. (1996)** Epothilone A and B-novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: Isolation, crystal structure, and conformation in solution, *Angewandte Chemie (International Edition in English)* 35, 1567-1569.
102. **Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, C. M. (1995)** Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol- like mechanism of action, *Cancer Research* 55, 2325-2333.
103. **Kügler, J., Nieswandt, S., Gerlach, G. F., Meens, J., Schirrmann, T., and Hust, M. (2008)** Identification of immunogenic polypeptides from a Mycoplasma hyopneumoniae genome library by phage display, *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 447-458.
104. **Ishii I., Katagir M., Sakazume K., and T., M. (1966)** Antibacterial effect of photosensitising dyes on *Xanthomonas oryzae*, leaf blight bacteria on rice

plants. I. The relationship between the chemical structure of dyes and their antibacterial activity [in Japanese]. , *Nippon Voguei Kagaku Kaishi* 40, 437-442.

105. **Dziejman, M., Balon, E., Boyd, D., Fraser, C. M., Heidelberg, J. F., and Mekalanos, J. J. (2002)** Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: Genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1556-1561.
106. **Klebe, G., (Ed.) (2009)** *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
107. **Diestel, R. (2010)** Biologische Charakterisierung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten unter besonderer Berücksichtigung von High-Content Analysemethoden, TU Braunschweig, Dissertation.
108. **Bandow, J. E., Brötz, H., Leichert, L. I. O., Labischinski, H., and Hecker, M. (2003)** Proteomic approach to understanding antibiotic action, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 948-955.
109. **Dötsch, A., Klawonn, F., Jarek, M., Scharfe, M., Blöcker, H., and Häussler, S. (2010)** Evolutionary conservation of essential and highly expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Genomics* 11.
110. **Illumina. (2010)**
http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_genome_analyzer.pdf.
111. **Holt, K. E., Teo, Y. Y., Li, H., Nair, S., Dougan, G., Wain, J., and Parkhill, J. (2009)** Detecting SNPs and estimating allele frequencies in clonal bacterial populations by sequencing pooled DNA, *Bioinformatics* 25, 2074-2075.
112. **Csonka, L. N., and Hanson, A. D. (1991)** Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology, *Annual Review of Microbiology* 45, 569-606.
113. **Bakker, E. P. (1993)** Low-affinity K^+ uptake systems. In E. P. Bakker (ed.), Alkali cation transport systems in prokaryotes., *CRC Press, Boca Raton, Fla.*, 253-276.
114. **Walderhaug, M. O., Polarek, J. W., Voelkner, P., Daniel, J. M., Hesse, J. E., Altendorf, K., and Epstein, W. (1992)** KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators, *Journal of Bacteriology* 174, 2152-2159.
115. **Heermann, R., Weber, A., Mayer, B., Ott, M., Hauser, E., Gabriel, G., Pirch, T., and Jung, K. (2009)** The Universal Stress Protein UspC Scaffolds the KdpD/KdpE Signaling Cascade of *Escherichia coli* under Salt Stress, *Journal of Molecular Biology* 386, 134-148.

116. **Parkinson, J. S., and Kofoed, E. C. (1992)** Communication modules in bacterial signaling proteins, *Annual review of genetics* 26, 71-112.
117. **Clatworthy, A. E., Pierson, E., and Hung, D. T. (2007)** Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy, *Nature Chemical Biology* 3, 541-548.
118. **Rasko, D. A., and Sperandio, V. (2010)** Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease, *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 117-128.
119. **Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., Garcia, L. R., Tomás, M., and Wood, T. K. (2011)** Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds, *ISME Journal*.
120. **Iwanaga, M., and Yamamoto, K. (1985)** New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* 01 biotype El Tor, *Journal of Clinical Microbiology* 22, 405-408.
121. **Srivastava, D., Harris, R. C., and Waters, C. M. (2011)** Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology* 193, 6331-6341.
122. **Selby, T. P., Bereznak, J. F., Bisaha, J. J., Ding, A. X., Gopalsamuthiram, V., Hanagan, M. A., Long, J. K., and Taggi, A. E. (2009)** Substituted azoles as fungicides and their preparation, p 274pp.
123. **Dorfmeister, G., Franke, H., Geisler, J., Hartfiel, U., Bohner, J., and Rees, R. (1994)** Preparation of substituted pyrazole derivatives and their use as herbicides, p 129 pp.
124. **Atkinson, R. N., and Gross, M. F. (2003)** Pyrazolecarboxamides and -sulfonamides as sodium channel blockers, p 132 pp.
125. **Goldfarb, D. S. (2009)** Method using lifespan-altering compounds for altering the lifespan of eukaryotic organisms, and screening for such compounds, p 57pp.
126. **Gehring, R., Schallner, O., Stetter, J., Santel, H. J., Schmidt, R. R., and Luerssen, K. (1987)** Preparation of nitropyrazole herbicides, p 33 pp.
127. **Sanson, D., and Armbruster, J. A. (2008)** Auxin acid-catalyzed stable microemulsion pesticide formulation, p 10pp.; Chemical Indexing Equivalent to 149:169454 (WO).
128. **Gebauer, O., Gayer, H., Heinemann, U., Herrmann, S., Hillebrand, S., Elbe, H. L., Ebbert, R., Wachendorff-Neumann, U., Dahmen, P., and Kuck, K. H. (2005)** Preparation of pyrazolopyrimidines as agrochemical fungicides, p 71 pp.

129. **Mallais, T., Moradei, O., Ajamian, A., Tessier, P., Smil, D., Frechette, S., Machaalani, R., Leit, S., Beaulieu, P., Deziel, R., and Mancuso, J. (2009)** Preparation of N-hydroxybenzamide and N-hydroxyheterocyclecarboxamide derivatives as inhibitors of histone deacetylase (HDAC), p 164pp.
130. **Zaugg, H. E. (1974)** Oxazoles and their use as herbicides, p 3 pp.
131. **Mendoza, J. S., Dickson, J. K., Jr., and Hodge, C. N. (2007)** Heterocycle-substituted oxazoles as inhibitors of ATP-kinases for treatment of tumors, immune disorders and inflammation-related diseases, p 93pp.
132. **Love, C. J., Van, W. J. P. F., De, B. M. J., Moses, R. C., Goncharenko, M., Cooymans, L. P., Vandermaesen, N., Diels, G. S. M., Sibley, A. W., and Noula, C. (2003)** Preparation of pyrimidinylthiazoles as antiinflammatories, p 97 pp.
133. **McInnes, C., McLachlan, J., Mezna, M., and Fischer, P. (2005)** Use of crystal structure of Plk1 kinase in screening for inhibitors for treatment of cancer, glomerulonephritis, rheumatoid arthritis, psoriasis and chronic obstructive pulmonary disorder, p 184 pp.
134. **Kodama, Y., Noji, S., Imamura, K., Mizojiri, R., Aoki, K., Takagi, H., Naka, Y., Ito, G., Shinoda, K., Fujiwara, A., Kurihara, K., and Tanaka, M. (2006)** Preparation of aminopyridine compounds with spleen tyrosine kinase (Syk)-inhibitory activity, p 467pp.
135. **Smith, A. L., Brennan, P. E., Demorin, F. F., Liu, G., Paras, N. A., and Retz, D. M. (2006)** Aminopyrimidine compounds as polo-like kinase 1 inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use for treatment of cancer, p 151 pp.
136. **Brenchley, G., Farmer, L. J., Harrington, E. M., Knegt, R., O'Donnell, M., Salituro, F. G., Studley, J. R., and Wang, J. (2004)** Preparation of thiazoles as inhibitors of protein kinases, p 139 pp.
137. **Greul, J. N., Gaertzen, O., Dunkel, R., Guth, O., Hillebrand, S., Ilg, K., Schreier, P., Wachendorff-Neumann, U., Dahmen, P., Voerste, A., and Hadano, H. (2007)** Preparation of thiazole derivative fungicides, p 194 pp.
138. **Bratz, M., Meyer, N., Koenig, H., Walter, H., Gerber, M., and Westphalen, K. O. (1995)** Preparation of naphthyridines as herbicides, p 26 pp.
139. **Boger, D. L. (2009)** Preparation of C4-substituted alpha-keto oxazoles as therapeutic fatty acid amide hydrolase inhibitors, p 68 pp.
140. **Ontoria, J. M., Altamura, S., Di, M. A., Ferrigno, F., Laufer, R., Muraglia, E., Palumbi, M. C., Rowley, M., Scarpelli, R., Schultz-Fademrecht, C., Serafini, S., Steinkuhler, C., and Jones, P. (2009)** Identification of Novel, Selective, and Stable Inhibitors of Class II Histone Deacetylases: Validation Studies of the

Inhibition of the Enzymatic Activity of HDAC4 by Small Molecules as a Novel Approach for Cancer Therapy, *J. Med. Chem.* 52, 6782-6789.

141. **Li, M., Ni, N., Chou, H. T., Lu, C. D., Tai, P. C., and Wang, B. (2008)** Structure-based discovery and experimental verification of novel AI-2 quorum sensing inhibitors against *Vibrio harveyi*, *ChemMedChem* 3, 1242-1249.
142. **Nan, F., Zuo, J., Wang, W., Wang, G., Chen, H., and He, P. (2006)** Preparation of bisheterocyclic compounds as antiviral agents, p 71pp.
143. **Watanabe, T., Araki, N., Arahira, M., and Kokaji, Y. (2005)** Preparation of 2-chloro-1,3-thiazole-5-methanol derivatives and agrochemical pesticides for plant diseases containing them, p 14 pp.
144. **Hung, D. T., Shakhnovich, E. A., Pierson, E., and Mekalanos, J. J. (2005)** Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization, *Science* 310, 670-674.
145. **Shakhnovich, E. A., Sturtevant, D., and Mekalanos, J. J. (2007)** Molecular mechanisms of virulence resistance by non-O1/non-O139 strains of *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology* 66, 1331-1341.
146. **Bina, X. R., Philippart, J. A., and Bina, J. E. (2009)** Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholerae*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 103-108.
147. **Hamood, A. N., Pettis, G. S., Parker, C. D., and McIntosh, M. A. (1986)** Isolation and characterization of the *Vibrio cholerae* recA gene, *Journal of Bacteriology* 167, 375-378.
148. **Strocher, U. H., Lech, A. J., and Manning, P. A. (1994)** Gene sequence of recA⁺ and construction of recA mutants of *Vibrio cholerae*, *Molecular and General Genetics* 244, 295-302.
149. **Fliege, R., Tong, S., Shibata, A., Nickerson, K. W., and Conway, T. (1992)** The Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase, *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3826-3829.
150. **Tavender, T. J., Halliday, N. M., Hardie, K. R., and Winzer, K. (2008)** LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate, *BMC Microbiology* 8.
151. **Frankenberg, N., Moser, J., and Jahn, D. (2003)** Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application, *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 115-127.

152. **O'Brian, M. R., and Thöny-Meyer, L. (2002)** Biochemistry, regulation and genomics of haem biosynthesis in prokaryotes, *Advances in Microbial Physiology* 46, 257-318.
153. **Nishimura, K., Nakayashiki, T., and Inokuchi, H. (1995)** Cloning and identification of the hemG gene encoding protoporphyrinogen oxidase (PPO) of Escherichia coli K-12, *DNA Research* 2, 1-8.
154. **Sasarman, A., Chartrand, P., Lavoie, M., Tardif, D., Proschek, R., and Lapointe, C. (1979)** Mapping of a New hem Gene in Escherichia coli K12, *J Gen Microbiol* 113, 297-303.
155. **Jacobs, J. M., Sinclair, P. R., Gorman, N., Jacobs, N. J., Sinclair, J. F., Bement, W. J., and Walton, H. (1992)** Effects of diphenyl ether herbicides on porphyrin accumulation by cultured hepatocytes, *Journal of biochemical toxicology* 7, 87-95.
156. **Dailey, T. A., Meissner, P., and Dailey, H. A. (1994)** Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase, *Journal of Biological Chemistry* 269, 813-815.
157. **Boynton, T. O., Daugherty, L. E., Dailey, T. A., and Dailey, H. A. (2009)** Identification of Escherichia coli HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity, *Biochemistry* 48, 6705-6711.
158. **Ferreira, G. C., Andrew, T. L., Karr, S. W., and Dailey, H. A. (1988)** Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex, *Journal of Biological Chemistry* 263, 3835-3839.
159. **Mafu, A. A., Plumety, C., Deschênes, L., and Goulet, J. (2011)** Adhesion of Pathogenic Bacteria to Food Contact Surfaces: Influence of pH of Culture, *International Journal of Microbiology* 2011, 1-10.
160. **Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C., Hoffmann, W. H., Peschel, A., Wolz, C., and Goerke, C. (2010)** Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of staphylococcus aureus nasal colonization, *Journal of Infectious Diseases* 201, 1414-1421.
161. **Golan, L., Gonen, E., Yagel, S., Rosenshine, I., and Shpigel, N. Y. (2011)** Enterohemorrhagic Escherichia coli induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models, *DMM Disease Models and Mechanisms* 4, 86-94.
162. **Abuaita, B. H., and Withey, J. H. (2009)** Bicarbonate induces Vibrio cholerae virulence gene expression by enhancing ToxT activity, *Infection and Immunity* 77, 4111-4120.

163. **Rousset, M. (1986)** The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation, *Biochimie* 68, 1035-1040.
164. **Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., and Wieler, L. H. (2006)** Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine, *Histochemistry and Cell Biology* 125, 293-305.
165. **Koh, S. Y., George, S., Brözel, V., Moxley, R., Francis, D., and Kaushik, R. S. (2008)** Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic Escherichia coli, *Veterinary Microbiology* 130, 191-197.
166. **Fullwood, M. J., Wei, C. L., Liu, E. T., and Ruan, Y. (2009)** Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses, *Genome Research* 19, 521-532.
167. **Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000)** Two-component signal transduction, in *Annual Review of Biochemistry*, pp 183-215.
168. **Ke, N., Wang, X., Xu, X., and Abassi, Y. A. (2011)** The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 740, 33-43.
169. **Mosley, W. H., and Ahmed, A. (1969)** Active and Passive Immunization in the Adult Rabbit Ileal Loop Model as an Assay for Production of Antitoxin Immunity by Cholera Vaccines, *J. Bacteriol.* 100, 547-549.
170. **Spira, W. M., Sack, R. B., and Froehlich, J. L. (1981)** Simple adult rabbit model for Vibrio cholerae and enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea, *Infection and Immunity* 32, 739-747.
171. **Baselski, V., Briggs, R., and Parker, C. (1977)** Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with Vibrio cholerae or cholera toxin in infant mice, *Infection and Immunity* 15, 704-712.
172. **Ujiye, A., and Kobari, K. (1970)** Protective effect on infections with Vibrio cholerae in suckling mice caused by the passive immunization with milk of immune mothers, *Journal of Infectious Diseases* 121.

Internetadressen

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE003852.1>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE003853.1>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2614932>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_232381.1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ513166.1>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/295848029?from=1&to=765&report=gbwithparts>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U09807.1>

http://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_genome_analyzer.pdf

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/blyz.cgi?cog=VCA0531&VCA0531>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/blyz.cgi?cog=kdpD&kdpD>

<http://pfam.sanger.ac.uk/>

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biofilmbildung von <i>V. cholerae</i> . Quelle: Watnick und Kolter, 2000 (12). ...	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Genverteilung des RS1-Elements und des RS2-Kernregion-Elements von CTXΦ. Quelle: modifiziert nach Faruque <i>et al.</i> , 2002 (20).	6
Abbildung 3: Cholera-Epidemiologie seit 1817. Quelle: Safa <i>et al.</i> , 2010 (22).	7
Abbildung 4: Anzahl gemeldeter Cholerafälle und Todesrate 1950-1998. Quelle: Dokument WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1 (25).	8
Abbildung 5: Funktionsweise des CTs. Quelle: Thiagarajah und Verkman, 2005 (44). ...	10
Abbildung 6: Regulation der Virulenzgenexpression durch ToxT. Quelle: modifiziert nach Nielsen <i>et al.</i> , 2010 (51).	11
Abbildung 7: Zelldichte-regulierte Signalkaskade zur Expression der Virulenzgene. Quelle: Matson <i>et al.</i> , 2007 (53).	12
Abbildung 8: Quorum Sensing in <i>V. cholerae</i> . Quelle: Camara <i>et al.</i> , 2002 (66).	13
Abbildung 9: Übersicht des Versuchsschemas des Adhäsionsassay.	44
Abbildung 10: Screeningplatten für die Suche nach Wachstum-inhibierenden Substanzen im 96- und 384-Well Format.	51
Abbildung 11: Formel zur Berechnung des Z'-Faktors. Quelle: Zhang <i>et al.</i> , 1999 (98).	52
Abbildung 12: Relatives Wachstum des Reporterstamms MO10 pG13.	54
Abbildung 13: Codes, Hersteller und Strukturformeln der aktiven Substanzen im Wachstumsassay.	56
Abbildung 14: MHK-Bestimmung für die Substanzen vz0500, vz0825 und 1541-0004.	57
Abbildung 15: Zytotoxizität der Substanzen vz0500, vz0825 und 1541-0004 in L929-Zellen.	61
Abbildung 16: Paired-End Sequenzierung. Quelle: Illumina, 2010 (110).	66
Abbildung 17: Sequenzvergleich des Wt Genoms und Genom pools an der Referenzposition 460.840.	70
Abbildung 18: Abgleich der VC_A0531 AS-Sequenz mit bekannten Protein Domänen in der Datenbank „Pfam“.	71
Abbildung 19: Schema der Domänenstrukturen von KdpD in <i>E. coli</i> . Quelle: modifiziert nach Heermann <i>et al.</i> , 2009 (115).	72
Abbildung 20: Fünf charakteristische Regionen „H“, „N“, „G1“, „F“ und „G2“ der HisKA Domäne. Quelle: modifiziert nach Parkinson <i>et al.</i> , 1992 (116).	73

Abbildung 21: Konservierte Regionen „H“, „N“, „G1“, „F“ und „G2“ im Gen VC_A0531.	73
Abbildung 22: Relatives Wachstum des Reporterstamms MO10 pAKSB.	77
Abbildung 23: Codes, Hersteller und Strukturformeln der aktiven Substanzen im CT-Screening.	78
Abbildung 24: IC ₅₀ -Bestimmung für vz0852 mit MO10 pAKSB.	79
Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Zytotoxizität von vz0852 im MTT-Test mit L929-Zellen.	80
Abbildung 26: Effekt der Substanzen vz0852, vz0761 und 53761188 auf das Wachstum von NM06-058 und N16961.	82
Abbildung 27: CT-Standardkurve erstellt mit handelsüblichem CT.	84
Abbildung 28: Relative CT-Konzentration im Überstand von NM06-058 Kulturen.	84
Abbildung 29: Western Blots der bakteriellen Lysate von NM06-058.	86
Abbildung 30: CT-Konzentration in Zelllysaten von NM06-058.	87
Abbildung 31: Messung der relativen mRNA-Konzentration von <i>aphA</i> und der Virulenzgene <i>ctxA</i> , <i>tcpA</i> unter Einfluss der aktiven Substanzen.	88
Abbildung 32: Häm-Biosyntheseweg (C5-Syntheseweg). Quelle: Nishimura <i>et al</i> , 1995 (153).	91
Abbildung 33: Wachstumskurven von <i>E. coli</i> K-12 <i>hemH</i> - und <i>hemG</i> -Mutanten. Quelle: Nishimura <i>et al</i> , 1995 (153).	92
Abbildung 34: Katalase-Aktivität von <i>E. coli</i> K-12: ○, SASX38; ●, Hfr Cavalli. Quelle: Sasarman <i>et al.</i> , 1979 (154).	93
Abbildung 35: Agarosegel der Kolonie-PCR von Stamm CM-2.	95
Abbildung 36: Agarosegele der Kolonie-PCR von DH5α pET33b(+): <i>hemG</i>	96
Abbildung 37: Agarosegel der Kolonie-PCR von BL21(DE3) pET33b(+): <i>hemG</i>	96
Abbildung 38: Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Western Blot zum Nachweis der PPO-Expression. (Beschriftung siehe nächste Seite)	97
Abbildung 39: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Fraktionen vor und nach Aufreinigung des exprimierten PPO über eine Ni-NTA-Agarose-Säule.	98
Abbildung 40: AS-Sequenz vom N-Terminus des exprimierten PPO.	99
Abbildung 41: Reaktion katalysiert durch O ₂ -abhängige PPO. Quelle: Boynton <i>et al.</i> , 2009 (157).	100
Abbildung 42: HPLC-Messung des Edukts Proto (A), des Zwischenprodukts (B) und Endprodukts (C).	101
Abbildung 43: Einsatz verschiedener PPO-Konzentrationen.	102
Abbildung 44: Verlauf der enzymatischen PPO-Reaktion und der Autoxidation.	102
Abbildung 45: Kontrollen des PPO-Assays, Messung nach 60 min.	103
Abbildung 46: Gleichmäßigkeit des PPO-Aktivitätsassays in einer 96-Well-MTP nach 60 min Reaktionszeit.	104

Abbildung 47: Relative PPO-Aktivität unter Einfluss der getesteten Substanzen.....	105
Abbildung 48: Konzentrationsabhängige Aktivität der Substanzen vz0073, vz0320 und vz0536.....	106
Abbildung 49: Code, Hersteller und Strukturformel der Hits des PPO-Aktivitätstests.	106
Abbildung 50: Anzahl und Position der Bilder innerhalb eines Wells (96-Well-MTP).....	110
Abbildung 51: Verschiedene Detektionsmethoden der adhärenenten Bakterien.....	111
Abbildung 52: Adhäsion von <i>V. cholerae</i> an IPEC-J2 Zellen.....	112
Abbildung 53: Adhäsionsuntersuchung der Positiv- und Negativkontrollen.....	113
Abbildung 54: Gleichmäßigkeit des Adhäsionsassays in einer 96-Well-MTP.....	114

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Modellbezeichnung, Hersteller und Firmensitz.....	19
Tabelle 2: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz.....	21
Tabelle 3: Kits unter Angabe des Lieferanten mit Firmensitz	22
Tabelle 4: Antikörper bzw. Farbstoff mit Lieferant	23
Tabelle 5: Medien für die Kultivierung von <i>V. cholerae</i> , <i>E. coli</i> und anderen Bakterien	23
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 7: Zelllinien.....	24
Tabelle 8: <i>V. cholerae</i> Wt- und Reporterstämme	25
Tabelle 9: Pathogene Keime.....	25
Tabelle 10: Peptidbibliotheken.....	26
Tabelle 11: Primer	27
Tabelle 12: Enzyme	27
Tabelle 13: Software.....	28
Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	36
Tabelle 15: RT-PCR Programm.....	38
Tabelle 16: qRT-PCR Protokoll.....	39
Tabelle 17: Kolonie-PCR Protokoll.....	40
Tabelle 18: Zusammenfassung der Wachstum reduzierenden Substanzen.....	55
Tabelle 19: Übersicht der MHK- und MBK-Werte von vz0500, vz0825 und 1541-0004.	58
Tabelle 20: MHK-Werte der Wirkstoffkandidaten für humanpathogene Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.	59
Tabelle 21: IC ₅₀ -Werte des MTT-Tests ermittelt in L929-Zellen.....	61
Tabelle 22: Aktivitäten ausgewählter Antibiotika	65
Tabelle 23: Zusammenfassende Statistik der Genomsequenzierung des Wt Genoms und des Genompools.....	68

Tabelle 24: SNPs des VC_A0531 Gens.....	69
Tabelle 25: AS-Austausch durch SNPs im Gen VC_A0531.	70
Tabelle 26: Zusammenfassung der MO10 pAKSB Wachstum reduzierenden Substanzen.	77
Tabelle 27: IC ₅₀ -Werte der aktiven Substanzen aus dem CT-Screening, ermittelt nach 24-stündiger Inkubation von Stamm MO10 pAKSB.	80
Tabelle 28: IC ₅₀ -Werte des MTT-Tests ermittelt in L929-Zellen.....	81
Tabelle 29: IC ₅₀ -Werte für vz0852, vz0761, 53761188 und Virstatin, detektiert mittels G _{M1} -ELISA.	85
Tabelle 30: Zusammenfassung der PPO-Aktivitätsinhibitoren.....	105

6.3. Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von *hemG* / HemG

Quelle: NCBI, Nukleotidsequenz / Aminosäuresequenz von *V. cholerae* N16961
Serotyp O1, Biotyp El Tor.

```

gtgaaagcggttactgttgtactcaagccaagaaggccaaacgcggaaaaattatcgaacgt
V K A L L L Y S S Q E G Q T R K I I E R
atcgctcagcagatgccggagtacgattgcgacatccaagatctgcatcagggtccatgag
I A Q Q M P E Y D C D I Q D L H Q V H E
atagcggttggcggattatgaaaaaatcttgattgggtgcatcgattcggttacggccgcctc
I A L A D Y E K I L I G A S I R Y G R L
aatgaaaagctctatcaatatttcaacgtcatgtcacgacgctgaccaatagcaaagcc
N E K L Y Q F I Q R H V T T L T N S K A
gctttcttctgcggtcaatctcaccgcgagaaaagaagatcaaggaaaagatacgccagaa
A F F C V N L T A R K E D Q G K D T P E
gggagtgtctatattcaaaccttctgaaaaagtcaccgtggcaaccagagcgtattgcc
G S V Y I Q T F L K K S P W Q P E R I A
gtatttgctggggcactgtattaccgcggttaccgttggttcgacaaaatgatgatacgt
V F A G A L Y Y P R Y R W F D K M M I R
ttgatcatgaccttgacggggggagaaacggataaccagtaaagaagtggagtacaccaat
L I M T L T G G E T D T S K E V E Y T N
tgggaaaaagtcctctcaatatttggtgaacaattccgcaattggtag
W E K V S Q F G E Q F R N W -

```

Aminosäuresequenz von VC_A0531

Quelle: NCBI, Sensor-Histidinkinase von *V. cholerae* N16961 Serotyp O1, Biotyp El Tor. In den Kästen sind die fünf konservierten Motive der HisKA dargestellt, wobei die grün markierten AS 100 %ig übereinstimmen. Unterstrichen sind die AS, die bei der Genompool-Sequenzierung einen Austausch zeigten, wobei das rot-markierte Threonin der wichtigste AS-Austausch ist.

```

MVTRLNEAHKALILVALYAMVTVVGVMYRKDMIETDVAMLFLLLNILSASVLKPRNAYVMMGLSIIDYHY

FLLPDYQSFRFENAOYVITYAVLAFSGIFAVNITQAQRKQIEKNKRLQQQHKKYYELACHLSALSTSEDI

AQATVKFLSKEKGIVSAIALYQPQWQWVAQHADFVAAIELPQPPLTDNTSTLVQDEQINAFTLVDRGTI

      H-Region
LGVIYFLRYPHERFASPEALRRESKIAPWVRSLTSLARAHARTLAHVEAEKQLESTRTTLLASVSHD

LKTPLGAIIGSATTLTDPSLHLSTETQQELLTSIAEQGERLNRSLTKLLDITRYTASALVPKLDWVEPEE

                        N-Region
LIGTVLSRLAPRLTHHKVQIESQPMLVELDSLLEQVLINLVENAAKYTTPRGSEIEIACAYQEQQFTLAV

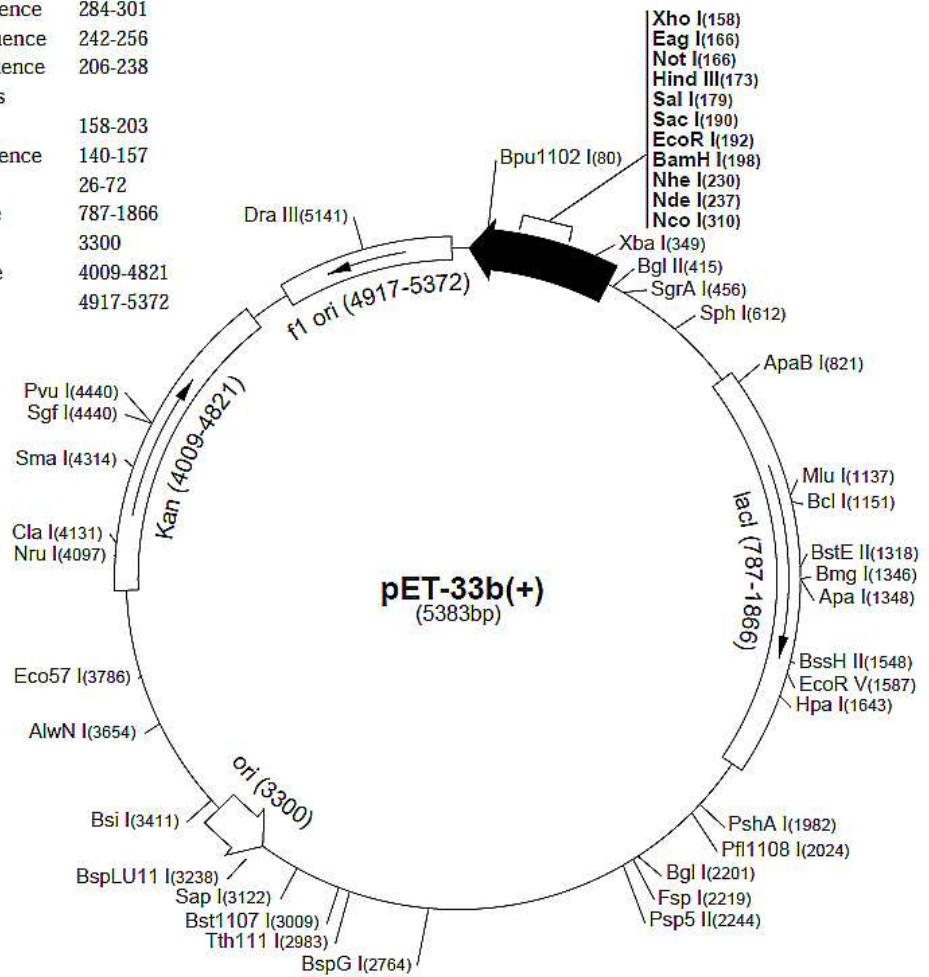
G1-Region      F-Region      G2-Region
MDNGAGIPDEALPRIFDRFYRVEGNHADGTGLGLAICQVIVA AHQGSIRVHNRESGGACFTVTIPCRQYN

LKELYEQ
  
```

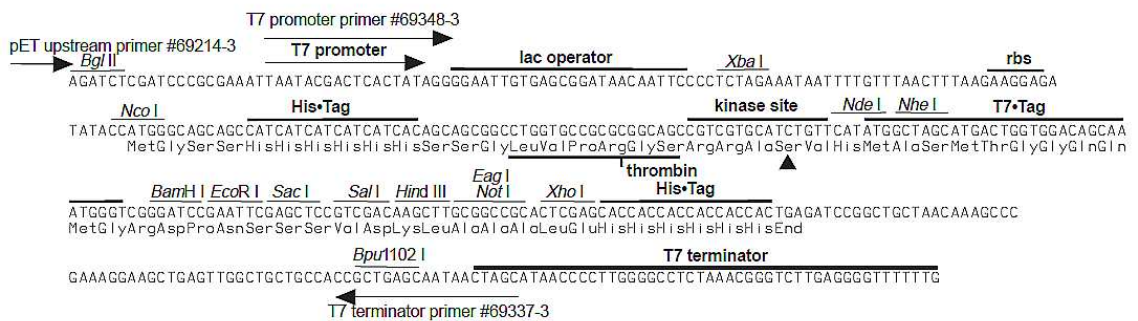
Klonierungsvektor pET-33b(+)

pET-33b(+) sequence landmarks

T7 promoter	384-400
T7 transcription start	383
His•Tag coding sequence	284-301
PKA site coding sequence	242-256
T7•Tag [®] coding sequence	206-238
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	787-1866
pBR322 origin	3300
Kan coding sequence	4009-4821
f1 origin	4917-5372



pET-33b(+) cloning/expression region



Danksagung

Prof. Dr. Katharina Riedel danke ich ganz herzlich für die Übernahme der Mentorenschaft, Prof. Dr. Norbert F. Käufer und Dr. Max Schobert möchte ich für die Bereitschaft der Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes danken.

Ein besonders großer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Dr. Werner Tegge für die hervorragende fachliche Betreuung, die wöchentlichen Besprechungen und die aufbauenden Worte in schwierigen Phasen der Arbeit.

Dr. Ranjan Kumar Nandy am NICED in Kalkutta danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen *Vibrio cholerae* Stämme, mit denen die Arbeit erst ermöglicht wurde. Besonders möchte ich mich zudem für den dreiwöchigen Gastaufenthalt in dem Forschungslabor in Kalkutta im Februar 2011 und die exzellente Unterstützung dort bedanken.

Den Mitgliedern meines Thesis-Komitees Dr. Carsten Matz, Dr. Florenz Sasse und Dr. Ronald Frank möchte ich für die hilfreichen Ideen und Tipps danken.

Tatjana Hirsch und Dr. Peter Washausen danke ich für die Pflege und Instandhaltung der Substanzsammlungen und die Beschaffung von Nachsubstanz, Bettina Hinkelmann danke ich für jegliche zellkulturbasierte Hilfe. Tabea Ellebracht danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Screening-Experimente.

Bei der gesamten Abteilung CBIO möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken. Meinen (ehemaligen) Bürokollegen und -innen Dr. Marc Reboll, Dr. Marina Steindorff und Ulrike Beutling danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Büro und die aufmunternden Gespräche zwischendurch. Ulrike möchte ich an dieser Stelle zusätzlich für die souveräne Beseitigung jeglicher EDV-Probleme danken.

Den Serviceeinheiten bzw. den Abteilungen des HZI, Genomanalytik und Biophysikalische Analytik, möchte ich für verschiedene Serviceleistungen wie ESI-MS-Messungen, Sequenzierungen etc. sowie freundliche Hilfestellungen danken, insbesondere Michael Jarek und Dr. Andreas Dötsch für die hervorragende Durchführung der Genomsequenzierung und der Unterstützung bei der Datenauswertung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester Elena und ihrer Familie, sowie meinem Bruder Peter, die stets für mich da waren und mir jederzeit und in jeglicher Form Unterstützung und Halt gaben.

Meinem Freund Alex, der seit fast fünf Jahren an meiner Seite ist und mich durch viele kleine und große Krisen begleitet hat, danke ich ganz besonders. Das Leben zusammen mit dir ist viel einfacher. Ich danke dir an dieser Stelle für deine liebevolle Geduld und deine stetige Unterstützung.

